

UNIVERSITE LILLE – DROIT ET SANTE

U.F.R. DE BIOLOGIE – SANTE

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement

Par

**Mohamed BOUSALEH**

Le 16 décembre 2019

Titre :

**Définir de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'hépatite  
alcoolique : nécessité d'une approche translationnelle**

---

Directeur de thèse : Professeur Alexandre LOUVET (M.D., Ph.D., HDR)

Co-Directeur de thèse : Dr. Laurent DUBUQUOY (Ph. D)

---

**JURY**

Pr. Richard MOREAU

Rapporteur

Pr. Isabelle LECLERCQ

Rapporteur

Pr. Ariane MALLAT

Examineur

Pr. Stéphanie TRUANT

Présidente du jury

Pr. Philippe MATHURIN

**Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien financier de :**

- Co-financement INSERM-Région HAUT de France décerné à l'issue du concours de l'école doctorale de Lille en 2015.
- L'Association française d'étude du foie (AFEF).
- Le « National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism » (NIAAA/NIH).

**Présentations orales en congrès nationaux**

- JFOHD 2018 : Défaut de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le foie de patients avec une hépatite alcoolique sévère : vers de nouvelles stratégies thérapeutiques. PARIS 22/25 Mars 2018.
- AFEF 2019 : Nouveaux mécanismes cellulaires impliqués dans le défaut de régénération du foie décrit chez les patients atteints d'hépatite alcoolique. MARSEILLE 2/5 Octobre 2019.

**Présentation orale en congrès international**

- AASLD 2019: New insights in cellular mechanisms involved in the liver regeneration defect described in patients with severe alcoholic hepatitis. USA, BOSTON 8/12 November. Cette présentation a été classée dans la catégorie « Best of The Liver Meeting ».

## PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

- 1- **Bou Saleh M**, Lassailly G, Ningarhari M, Gnemmi V, Maggiotto F, Artru F, Boleslawski E, Anglo E, Sancho-Bru P, Truant S, Corlu A, Argemi J, Dharancy S, Bataller R, Mathurin P, Louvet A, Dubuquoy L. New insights in cellular mechanisms involved in the liver regeneration defect described in patients with severe alcoholic hepatitis, *Hepatology* 2019 ;70 (suppl1) :173A-173A
- 2- Lassailly G, **Bou Saleh M**, Leleu-Chavain N, Ningarhari M, Gantier E, Carpentier R, Artru F, Gnemmi V, Bertin B, Maboudou P, Didier B, Gheeraert C, Maggiotto F, Dharancy S, Mathurin P, Louvet A, Dubuquoy L. Nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) modulates liver ischemia reperfusion through the expression adhesion molecules. *J Hepatol* 2019 ;70 :1159–1169.
- 3- Artru F, **Bou Saleh M**, Maggiotto F, Lassailly G, Ningarhari M, Helou DG, Dharancy S, Gantier E, Périanin A, Chollet-Martin S, Bataller R, Mathurin P, Dubuquoy L, Louvet A (2019). IL-33/ST2 pathway regulates neutrophil migration and predicts outcome in severe alcoholic hepatitis *J Hepatol* 2019; In-Press.
- 4- **Bou Saleh M**, Lassailly G, Gnemmi V, Maggiotto F, Ningarhari M, Artru F, Boleslawski E, Anglo E, Sancho-Bru P, Truant S, Corlu A, Argemi J, Dharancy S, Eeckhoutte J, Bataller R, Mathurin P, Louvet L, Dubuquoy L. Loss of hepatocyte identity under aberrant YAP activation as a central mechanism of alcoholic hepatitis pathogenesis. En préparation.
- 5- Sidahmed-Adrar N, Ottavi JF, Benzoubir N, Ait Saadi T, **Bou Saleh M**, Mauduit P, Guettier C, Desterke C, Le Naour F. Tspan15 Is a New Stemness-Related Marker in Hepatocellular Carcinoma. *Proteomics* 2019;7: e1900025

## **Remerciements**

Je tiens à remercier chaleureusement les Professeurs Richard MOREAU, Isabelle LECLERCQ, Ariane MALLAT et Stéphanie TRUANT de m'avoir honoré en acceptant de participer à mon jury de thèse malgré leurs emplois du temps très chargés.

Un grand merci au Professeur Philippe MATHURIN. Auprès de lui, j'ai eu grand plaisir à travailler, de pouvoir discuter et d'échanger sur les résultats, mais aussi sur les difficultés rencontrées. Merci pour votre temps précieux que vous m'avez consacré, et pour vos encouragements et soutiens constants. Je souhaite souligner combien vous êtes soucieux pour la carrière des jeunes comme moi ; c'est un point qui m'a particulièrement touché. Finalement, j'ai aussi pris plaisir à discuter avec vous les quelques fois hors contexte professionnel. Votre sympathie et votre humanité m'ont marqué.

Mille mercis au Professeur Alexandre LOUVET qui a dirigé ma thèse et qui m'a efficacement encadré en participant à de nombreuses réunions scientifiques. Nous avons échangé à de nombreuses reprises et avons beaucoup réfléchi aux hypothèses scientifiques pour construire notre ligne de conduite de travail. Sans son aide, et son expertise médicale et scientifique méticuleuse, je n'aurais jamais pu aboutir à de tels résultats. Il m'a beaucoup appris sur la rigueur et la démarche scientifique. Aussi, ses conseils précis et appliqués pour cuisiner pour les souris (avec une touche d'alcool bien sur) m'ont permis préparer le fameux plat Lieber-de-Carli. Ce n'est pas une mince affaire ! Ni toute l'expérience animale qui suit d'ailleurs. Un grand merci à toi pour ça aussi.

Je tiens également exprimer ma sincère gratitude à l'encadrement exceptionnel du Docteur Laurent DUBUQUOY qui m'a accompagné durant ces 4 années de thèse, chaque jour, qui m'a soutenu, encouragé et surtout m'a fait progresser sur le plan scientifique et personnel de manière significative ( $P = 0,002$ ). Merci Laurent pour ta présence, pour toutes tes remarques pertinentes, tes idées précieuses, pour le temps que tu m'as consacré à me former et à devenir ce que je suis aujourd'hui. Merci d'avoir été présent comme ami, confident et conseillé, pour m'avoir épaulé dans les moments difficiles. Laurent, je sais que ces quelques lignes ne suffiront jamais à te remercier suffisamment. Tu m'as accordé ta confiance en me donnant des responsabilités au sein du laboratoire, en m'intégrant dans ton

équipe (et memes tes équipes) et en me permettant d'aller de l'avant avec toutes les formations que tu m'as autorisé à suivre.

Une pensée particulière aux Docteur Guillaume LASSAILLY, Docteur Florent ARTRU et Docteur Massih NINGARHARI pour leurs disponibilités, leur bienveillance, leurs soutiens et leurs conseils précieux au sein de l'équipe Hépat0. Souvent présents lors de nos nombreuses réunions du vendredi, ils m'ont aidé à résoudre des points bloquants et améliorer nos résultats finaux. Je n'oublierais pas toute votre aide.

A mon meilleur ami qui m'a accompagné tout au long de cette aventure, à mon confident, à mon co-équipier, à mon soutien permanent, à la personne qui a été pour moi le plus présent, à mon mentor technique, à Franchesko DILABELI, à toi FRANCOIS MAGGIOTTO. Je tiens à te préciser que te remercier en quelques phrases ne reflétera jamais toute la gratitude que j'ai envers toi. Merci de m'avoir pris « sous ton aile » et de m'avoir formé à toutes les techniques dans le labo. Merci François d'avoir été le soutien capital, tu m'as obligé à me relever après chaque déception, ou lors des moments difficiles pour aller de l'avant. Tu as su transformer la période de cette thèse difficile en une vraie période de plaisir, riche en beaux souvenirs partagés ensemble. Je cite : l'évènement de la naissance de ta petite Gianna, nous avons été ensemble en salle de WB. Mon mariage ; tu as été à côté de moi en tant que témoin de mariage. Les petits restaurants pour les grandes faims entre midi et deux. Les petits cours en italien qui m'ont fait découvrir la beauté et la richesse de cette langue à chaque fois que j'utilise Google traduction. Les petites pauses entre deux perfusions de foie ; des occasions pour se plaindre et pour « râler » sur le reste du travail à fournir depuis le matin jusqu'au soir assez tard ! Mais qu'on réussissait à « dégommer » à chaque fois ! Merci mon ami, merci François.

Un remerciement spécial au Docteur Bertrand MERESSE pour son soutien, ses conseils, sa bonne humeur, et pour m'avoir aidé sur le plan personnel en proposant une thèse de recherche à mon épouse Fatima dans le même laboratoire.

Un grand merci à Virginie CHAMEROY, Bernadette LEU et Caroline GAVELLE pour leur bienveillance, leurs soutiens et leur gentillesse au quotidien.

Un grand merci à Caroline DUBUQUOY qui, durant ces 4 ans, n'a jamais manqué de venir tous les matins nous dire bonjour avec sa perpétuelle bonne humeur, une bise en prime, de quoi bien débuter notre journée.

Un grand merci aux filles « Cécile et Mathilde » pour leur gentillesse, leurs conseils et au temps partagé pendant l'heure du repas. Quelle patience que vous avez ! à m'écouter me plaindre de tout et de rien. Merci à vous.

Merci à mes amis Christophe, Madjid, Sylvia, Antony, Salah, Eva, Matthias, Thomas et Audrey auprès de qui je trouvais le temps de me ressourcer, d'avoir des conseils techniques et scientifiques, et pour les beaux moments passés ensemble. Beaucoup de fous rires que nous avons partagé (very bad trip).

Merci à Marie DELBEKE, Aurélien PAGNY et Arnaud DENDOOVEN d'avoir été présents, ainsi que leurs bons conseils. Merci à vous, même si vous m'avez fait découvrir à quel point j'étais nul en mots croisés.

Merci à toute l'équipe de chirurgie digestive du Professeur PRUVOT, Professeur Emmanuel BOLESZLAWSKI, Professeur Stéphanie TRUANT, Docteur Guillaume MILLET, et les Docteurs Mehdi ELAMRANI, Lucil SCHNEIDER, Caroline VALIBOUZE et Léna M'BA.

Je souhaite exprimer mes profonds remerciements au Professeur SABLONNIERE, à François DELECROIX et à Madame Hélène HERMINET qui ont été présents pour faciliter toutes les démarches administratives de cette thèse.

Enfin, merci à tous les membres de la famille de l'unité U995 qui ont contribué à faire de ces 4 années de thèse une agréable aventure.

Un remerciement provenant du fond de mon cœur aux deux piliers de ma vie qui ont permis de faire de moi ce que je suis devenu aujourd'hui. A ma Maman et à mon Papa pour vos nombreux sacrifices et votre soutien tout au long de mon parcours scolaire et universitaire. Vos efforts et votre amour sont impossibles à résumer en quelques phrases. Merci de m'avoir encouragé dans les moments les plus difficiles et d'avoir toujours été à mes côtés. Je vous aime et je vous dédicace ce travail qui n'aurait jamais été possible sans vous. Les inoubliables expressions pour me motiver et que je garde en tête pour toujours « la vraie force est de pouvoir se relever après un échec et de le transformer en tremplin pour avancer » et « quand t'es au pied du mur c'est là où tu sors toute ta puissance pour le surmonter, continuer et foncer ». Merci Maman, merci Papa cette réussite est d'une certaine manière votre réussite.

Merci à toi, Nour la prune de mes yeux, ma confidente de tous les jours. Tu as toujours été présente pour me soutenir et m'aider dans les décisions à prendre. A toi ma grande sœur, notre petite princesse, la fierté de notre famille, notre chirurgienne, merci à toi ma nounoutte. Je n'oublierais jamais toutes les heures qu'on a passé ensemble au téléphone pour te raconter le détail de chaque jour. Tu as toujours été là pour me dire que tout se passerait bien. Merci Nanous, je t'aime ma sœurette.

A mon frère jumeau, mon compagnon d'aventure, je te souhaite plein de succès dans ta vie et un très beau mariage cet été avec ta belle et gentille pharmacienne qui vient agrandir encore plus notre famille, notre petite et adorable Rayan.

A mon beau-frère Ahmed, mon partenaire des deux premières années de thèse. Merci pour ces beaux moments, des souvenirs inoubliables à Valenciennes lors de la collocation ensemble. Les moments riches en émotion forte et en bonheur qu'on a vécu lors de ton mariage avec notre princesse Nour.

Mes pensées vont à ma grand-mère téta Fariha et à mes autres grands-parents qui ne sont plus de ce monde mais que je n'oublierais jamais.

Un grand merci pour mes tantes et mes oncles qui ont cherché à avoir en permanence de mes nouvelles et qui ont attisé ma volonté d'avancer et de réussir.

Un grand merci à ma belle-famille, à tante Amina et mon beau-père Youssef, à mes beaux-frères Mohammed et Mahmoud qui ont été toujours présents pour nous, moi et Fatima.

A toi ma Chérie, ma petite perle et princesse, qui m'a supporté pendant cette aventure et qui a partagé avec moi tous les moments, bons ou difficiles. Même lorsque tu étais encore loin de moi, que nous étions séparés par une mer, tu as réussi à être présente, à côté de moi, avec des heures passées au téléphone le soir pour connaître le détail de chaque jour. A toi qui a tout mis en place pour que je puisse me sentir à l'aise à la maison, pour que je puisse rédiger dans les meilleures conditions mon rapport de thèse. A toi qui a décidé de partager ta vie avec moi pour le meilleur et pour le pire. Tu es mon plus grand soutien, et a toujours trouvé les mots qu'il faut pour me rassurer. A ma femme, que j'aime et que j'aimerais toujours. Merci Fatima pour ton amour qui m'a permis d'être heureux et de me surpasser en donnant le meilleur de moi-même. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi ma Chérie. Les mots ne pourront jamais te témoigner toute ma gratitude et mon Amour pour toi.

## Table des matières

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	4
<b>INTRODUCTION</b> .....	7
<b>1- Anatomie et physiologie hépatique</b> .....	8
<b>2- La maladie alcoolique du foie (MAF)</b> .....	10
2-1 <i>Epidémiologie de MAF</i> :.....	10
2-2- <i>Physiopathologie MAF</i> : .....	11
2-3- <i>L'hépatite alcoolique aiguë</i> : .....	16
2-3- <i>L'hépatite alcoolique une physiopathologie complexe</i> : .....	20
<b>3- Le polynucléaire neutrophile (PNN)</b> :.....	24
3-1- <i>Le neutrophile et sa fonction</i> : .....	24
3-2- <i>Recrutement et activation du neutrophile</i> : .....	26
3-3- <i>Le rôle du neutrophile au cours de l'atteinte hépatique</i> : .....	29
3-4- <i>Le PNN dans l'hépatite alcoolique</i> : .....	31
<b>4- La régénération hépatique</b> : .....	33
4-1- <i>Historique de la régénération du foie</i> : .....	33
4-2- <i>Les acteurs de la régénération hépatique</i> : .....	34
4-3- <i>Régénération médiée par les hépatocytes</i> :.....	35
4-3-1 <i>La phase d'initiation</i> :.....	36
4-3-2- <i>La phase de prolifération</i> :.....	38
4-3-3- <i>La phase de terminaison</i> :.....	40
4-4- <i>La régénération médiée par les HPC</i> .....	41
4-4-1- <i>Marqueur des HPC</i> :.....	43
4-4-2- <i>Etude de traçage des HPC</i> :.....	45
4-5- <i>Inflammation, fibrose et régénération : un dialogue complexe</i> .....	50
4-6- <i>Le processus de régénération hépatique est défectueux dans l'HA</i> :.....	56
<b>5- La voie de signalisation Hippo/YAP</b> .....	59
5-1- <i>Composition de la voie de signalisation Hippo/YAP</i> .....	59
5-2- <i>YAP</i> : .....	61
5-3- <i>Régulation de la voie Hippo/YAP</i> :.....	64
5-3-1- <i>La régulation Hippo par la mécanotransduction</i> : .....	64
5-3-2- <i>Régulation YAP / TAZ par détection de nutriments</i> :.....	67
5-3-3- <i>Signalisation médiée par les récepteurs</i> :.....	67
5-4- <i>Hippo/YAP dans le développement</i> :.....	70
5-5- <i>YAP / TAZ favorise la dédifférenciation cellulaire en cellules souches</i> : .....	71



5-6- <i>La voie Hippo/YAP est un acteur essentiel dans la fibrose :</i> .....	73
5-7- <i>Hippo/YAP interagit avec des voies de signalisation importante dans le processus de régénération</i> .....	74
5-8- <i>Modulateur thérapeutique de la voie Hippo :</i> .....	76
<b>BUT DU TRAVAIL</b> .....	79
<b>TRAVAUX PERSONNELS</b> .....	82
<b>1- Loss of hepatocyte identity under aberrant YAP activation as a central mechanism of alcoholic hepatitis pathogenesis</b> .....	83
<b>2- Nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) modulates liver ischemia reperfusion through the expression adhesion molecules</b> .....	120
2-1 - Introduction Générale manuscrit 2 :.....	120
2-2- Résultats- manuscrit n°2 : J Hepatol 2019;70(6):1159-1169.....	123
2-3- Conclusion générale du manuscrit 2 :.....	164
<b>3- IL-33/ST2 pathway regulates neutrophil migration and predicts outcome in severe alcoholic hepatitis</b> .....	166
3-1- Introduction générale manuscrit 3 :.....	166
3-2- Résultats- Manuscrit n°3 : J Hepatol 2019 ; In-Press.....	169
3-3- Conclusion générale du manuscrit n°3.....	206
<b>Discussion générale</b> .....	208
<b>Conclusion générale et perspectives des travaux</b> .....	217
<b>Bibliographie</b> .....	219
<b>Résumé</b> .....	245
<b>Abstract</b> .....	247

## Figures

<b>Figure 1</b> : Illustration schématique montrant la structuration du foie (Song et al., 2017) .....	9
<b>Figure 2</b> : Consommation totale d'alcool par habitant .....	11
<b>Figure 3</b> : Evolution de la maladie alcoolique du foie avec les facteurs de risque et de comorbidité (Gao and Bataller, 2011a).....	15
<b>Figure 4</b> : représentation histologique du parenchyme hépatique d'un foie de patient atteint d'hépatite alcoolique aigue .....	18
<b>Figure 5</b> : Aspects complexes de la physiopathologie des lésions hépatiques induites par l'alcool (Lucey and Morgan, 2009).....	23
<b>Figure 6</b> : Représentation schématique des différentes étapes du processus du recrutement du PNN (Liew and Kubes, 2019b) .....	27
<b>Figure 7</b> : les différentes phases de la régénération hépatocytaires (Tao et al., 2017).....	36
<b>Figure 8</b> : Emplacement des progéniteurs hépatique dans le foie .....	42
<b>Figure 9</b> : La périodicité des dommages altère la capacité du tissu à revenir à l'homéostasie .....	50
<b>Figure 10</b> : illustration représentative des différents processus cellulaires impliqués dans l'homéostasies , la régénération, la fibrose et la cicatrisation hépatique (Cordero-Espinoza and Huch, 2018) .....	55
<b>Figure 11</b> : la voie de signalisation Hippo chez la drosophile et les mammifères.....	61
<b>Figure 12</b> : Représentation schématique illustrant les multiples domaines d'interaction de YAP et TAZ (Piccolo et al., 2014) .....	63
<b>Figure 13</b> : Interaction de la voie Hippo/YAP avec d'autre voie de signalisation (Ou et al., 2017) .....	76
<b>Figure 14</b> : la voie IL33 dans le PNN au cours du sepsis (Roger and Calandra, 2010).....	167

## Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Identification et caractérisation des cellules souches / progénitrices du foie chez l'adulte par tri cellulaire (Miyajima et al., 2014) .....	44
<b>Tableau 2</b> : Régulateurs directs et indirects de YAP1 et TAZ (Kodaka and Hata, 2015) .....	69
<b>Tableau 3</b> : Inhibiteurs de YAP .....	78

## LISTE DES ABREVIATIONS

AST : Aspartate Aminotransférase  
ALT : alanine Aminotransférase  
ADN : acide désoxyribonucléique  
AR : Amphiregulin  
AFP : alpha foeto proteine  
ANG2 : Angiopoétine2  
AMOT : angiomotin  
AMOTL: angiomotin like  
Alb : Albumin  
BMP : protéines morphogénétiques osseuses  
BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine  
CYP3A4 : Cytochrome P450 3A4  
CXCL : CXC chimiokines ligand  
Cdk : Cyclin-dependent kinase  
CK19 : cytokératine 19  
CD : cluster de différenciation  
CD133 : Prominine 1  
CDE : Déficient en choline et supplémenté en méthionine  
Ctnnb1 : gène de la  $\beta$ -caténine  
DDC: 3,5-dietoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine  
DLL: Delta-like ligand  
eNOS : expression de monoxyde d'azote  
EGF : facteur de croissance épidermique  
ERK : extracellular regulated MAP kinase  
EPCAM : Molécule d'Adhésion des Cellules Epithéliales  
ECM : Matrice Extracellulaire  
FXR: farnesoid X-activated receptor  
GPCR: G-protein coupled receptor  
gp130: glycoprotéine 130

GRK2: G protein–coupled receptor kinase 2

HA: Hépatite Alcoolique

HPC: Hepatique progenitor cells

HGF: hepatocyte growth factor

HB-EGF: Heparin-Binding EGF-like growth factor

HNF4a: Hepatocyte nuclear factor 4 alpha

IL: Interleukine

INF $\gamma$  : Interféron  $\gamma$

IL6R : Récepteur de l'interleukine 6

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule

IQGAP1: IQ motif–containing GTPase-activating protein 1

IR: ischémie-reperfusion

JAG1: jagged canonical Notch ligand 1

JAK: Janus kinase

KO: Knock out

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocytes T

LB : Lymphocytes B

LATS: large tumor suppressor

LSEC : cellules endothéliales

MAF : Maladie Alcoolique du Foie

MELD : Model End Stage Liver Disease

MyD88 : facteur de différenciation myéloïde 88

MAPK: mitogen activated kinase-like protein

Mats: scaffolding proteins Mob

NK: Natural killer

NF-Kb: Nuclear Factor- Kappa B

NCAM : Molécule d'Adhésion des Cellules Neurales

NICD : partie intracellulaire du récepteur Notch

NOD1: nucleotide binding oligomerization domain containing 1

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PNN : Polynucléaire Neutrophile

PHx : Hépatectomie Partielle

PI3K: phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase

PFK: phosphofructokinase

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

ROS : réactives de l'oxygène

STAT3: signal transducer and activator of transcription 3

SOCS: suppressor of cytokine signaling

Sox9 : SRY-box transcription factor 9

STE20: Sterile 20-like

Sav: Salvador VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

sST2: soluble receptor ST2

SHP: small heterodimer partner

TLR4: Toll like Receptor 4

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

TRAIL: tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

TGF-alpha: transforming growth factor alpha

TGF beta: Transforming Growth Factor beta

TAZ : tafazzin

TEAD : domaine activateur de la transcription

uPA : urokinase-type Plasminogene Activator

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VCAM : Vascular cell adhesion protein

Yki : Effecteur transcriptionnelle Yorkie

YAP: Yes-associated protein

ZO: tight junction protein

# INTRODUCTION

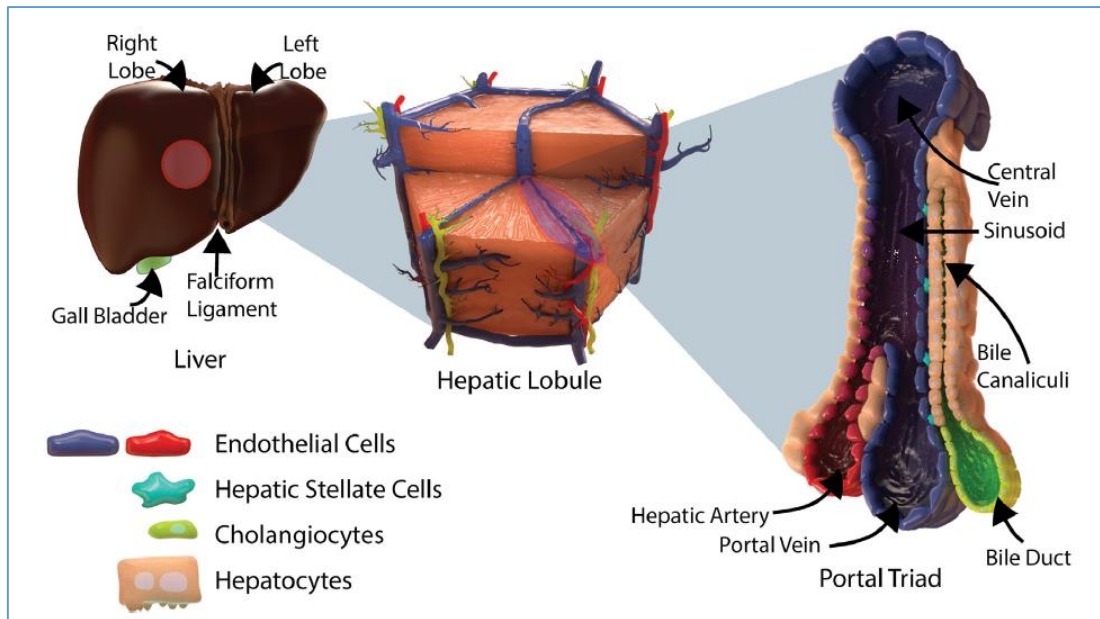
## 1- Anatomie et physiologie hépatique

Le foie représente 2 à 5% du poids total du corps faisant ainsi de lui, le plus grand organe dans le corps humain. Le foie des mammifères est organisé en une structure lobulaire de forme hexagonale, chaque lobe est composé de cellules épithéliales polarisées parenchymateuses, appelées hépatocytes. Les hépatocytes sont les principales cellules fonctionnelles du foie et exercent une multitude de fonctions dont la synthèse de la bile et du cholestérol ainsi que la prise en charge des divers métabolites glucidiques, protéiques et lipidiques. On retrouve à chaque coin du lobule hépatique une artère, une veine porte et un canal biliaire.

La veine porte a pour rôle de récupérer le sang désoxygéné riche en toxines et nutriments provenant de l'intestin. L'apport en oxygène nécessaire à la survie cellulaire du foie est réalisé par l'artère hépatique. Ainsi, le sang présent dans les veines des espaces portes circule dans des sinusoides composées de cellules endothéliales entourant les hépatocytes pour rejoindre la veine centrolobulaire.

La bile est sécrétée par les hépatocytes du parenchyme dans des canalicules biliaires qui rejoignent le canal de Hering situé dans l'espace porte (Boyer, 2013; Carpentier et al., 2011). Cette bile est ensuite modifiée par les cellules épithéliales biliaires nommés cholangiocyte puis converge dans le canal hépatique commun qui le stocke au niveau de la vésicule biliaire.

Outre les hépatocytes, les cholangiocytes et les cellules endothéliales, d'autres types de cellules sont présentes dans le foie, notamment les cellules étoilées hépatiques et les cellules de Kupffer. Les cellules étoilées sont présentes dans l'espace de Disse et sont les principales cellules impliquées dans le processus de fibrose hépatique. Les cellules de Kupffer sont des macrophages résidents dans le foie (Figure 1).



*Figure 1 : Illustration schématique montrant la structuration du foie (Song et al., 2017)*

Le foie humain a deux sections, les lobes droits et gauche, divisés par le ligament falciforme. Il est composé de lobules hexagonaux en unités fonctionnelles. Chaque lobule est assemblé à partir de plusieurs sinusoides. L'artère hépatique fournit du sang oxygéné (rouge) et la veine porte fournit du sang désoxygéné riche en nutriments (bleu) aux sinusoides. Le sang filtrera à travers l'endothélium pour entrer en contact avec les cellules étoilées hépatiques et les hépatocytes situés dans l'espace périsinusoïdal. Les hépatocytes transportent les acides biliaires du sang dans les canalicules biliaires. La bile (verte) s'écoule dans le sens inverse du sang dans les voies biliaires bordées de cholangiocytes (Song et al., 2017).



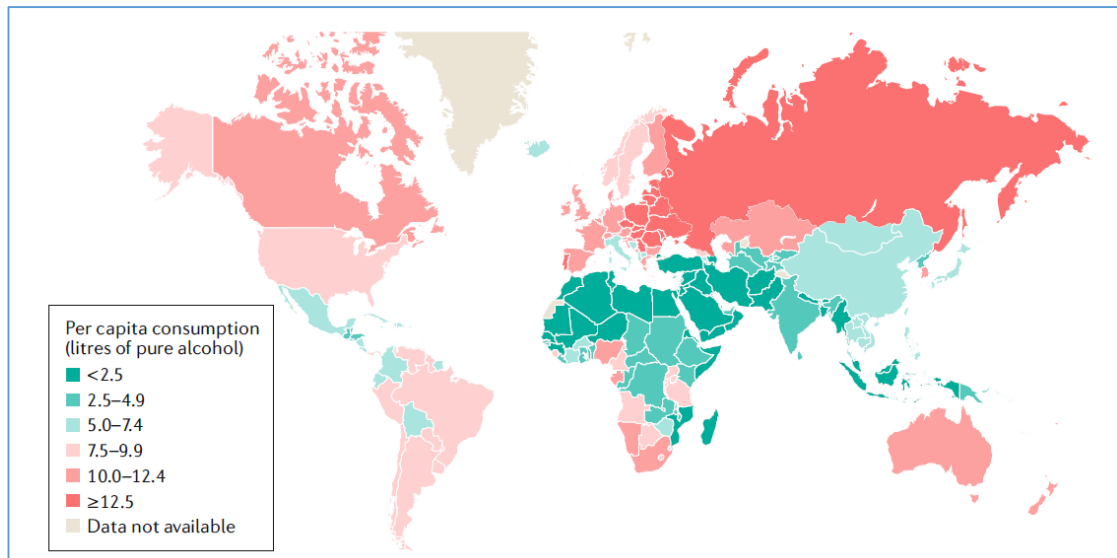
## 2- La maladie alcoolique du foie (MAF)

### 2-1 Épidémiologie de MAF :

L'alcool est la substance psychoactive la plus couramment utilisée en France, même si sa consommation a diminué au cours des 40 dernières années. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la France a été classée, en 2015, le 8ème pays le plus gros consommateur d'alcool avec 13 millions d'utilisateurs réguliers. Les coûts directs et indirects de l'abus d'alcool ont été évalués à 17 milliards d'euros (Livre Blanc de l'Hépatogastroentérologie). En France, 49000 décès étaient directement attribuables à l'alcool en 2009 dont 36500 d'hommes et 12500 de femmes (Base de données Santé publique France).

La consommation chronique journalière d'alcool est la cause de la survenue de la MAF. La consommation d'une quantité supérieure à 40g d'alcool pur par jour augmente considérablement la probabilité de développer la MAF (Bellentani and Tiribelli, 2001). De nouvelles données de la littérature stipulent même qu'une consommation chronique à des quantités variant entre 12 à 24g d'alcool par jour augmente le facteur de risque de développer une cirrhose (Rehm et al., 2010). Indiscutablement, le risque de MAF est corrélé à la durée pendant laquelle l'alcool a été consommé (Seitz et al., 2018).

La consommation d'alcool, la morbidité et la mortalité associées varient dans le monde entier et, selon l'OMS, l'Europe est la région du monde qui présente l'incidence la plus élevée de MAF (Mikton et al., 2016). Globalement, la consommation moyenne d'alcool pur chez les personnes âgées de plus de 15 ans est de 6,2 litres par personne et par an, alors que la consommation en Europe est de 10,9 litres par personne et par an (Figure 3).



**Figure 2 :** Consommation totale d'alcool par habitant

Une carte illustrant la consommation totale d'alcool par habitant et par région chez les personnes âgées de > 15 ans en 2010. Données du rapport mondial de l'OMS 2014

## 2-2- Physiopathologie MAF :

Le foie est une cible majeure de la toxicité de l'alcool. Ce composé est métabolisé au niveau des hépatocytes en deux étapes successives. Premièrement, l'alcool est transformé en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase présente au niveau hépatocytaire, ce composé ainsi obtenu présente une toxicité élevée qui conduit à la mort des hépatocytes. Pour se protéger de cette toxicité, les mitochondries des hépatocytes mettent en place un système de détoxification en métabolisant le composé acétaldéhyde toxique en acétate ou acide acétique grâce à l'enzyme acétaldéhyde déshydrogénase (Edenberg, 2007)..

Dans des conditions normales, l'éthanol est principalement métabolisé en acétaldéhyde dans le cadre d'un processus oxydatif induit par l'enzyme alcool déshydrogénase (ADH) et par un système microsomal basé sur les cytochromes P450, en particulier CYP2E1 (Louvét and Mathurin, 2015) (Lu and Cederbaum, 2008) (Cederbaum, 2012). Cette voie microsomale représente environ 10% de la biotransformation de l'éthanol. L'acétaldéhyde est responsable de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui induit un stress

oxydatif, du stress du réticulum endoplasmique (RE) et de la stéatose. De plus, après l'oxydation, la majeure partie de l'acétaldéhyde est convertie en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase. Cette réaction est catalysée par le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et augmente la quantité de NADH dans le foie (Lieber, 2004). L'alcool déshydrogénase, le CYP2E1 et l'aldéhyde déshydrogénase sont principalement exprimés dans les hépatocytes, ce qui explique pourquoi la toxicité de l'éthanol dans le foie affecte principalement ces cellules.

Le glutathion joue un rôle important dans la défense mitochondriale contre la génération constante de ROS, en particulier le peroxyde d'hydrogène. Cependant, une exposition chronique à l'alcool entraîne l'appauvrissement en glutathion. En conséquence, les capacités de détoxification de l'éthanol sont dépassées, ce qui entraîne l'accumulation de métabolites toxiques dans les hépatocytes (Garcia-Ruiz and Fernandez-Checa, 2006) (Hirano et al., 1992). Les conséquences sont la peroxydation des lipides, les dommages aux organites et la formation de stéatose.

Le foie est une cible majeure de la toxicité de l'alcool. La maladie alcoolique du foie (MAF) est de manière générale sous-diagnostiquée en raison d'une longue période asymptomatique. Elle englobe plusieurs entités anatomocliniques (Figure 2) (Inserm. Alcool effet sur la santé. Paris ; 2001).

Une réponse précoce physiopathologique de la consommation chronique d'alcool est l'accumulation de graisse (principalement de triglycérides, de phospholipides et d'esters de cholestérol) dans les hépatocytes : la stéatose hépatique (ou foie gras) (Purohit et al., 2009). La stéatose (forme bénigne) est retrouvée chez 80 à 90% des buveurs excessifs. L'acétate provenant de la métabolisation de l'acétaldéhyde est convertie en acétyl-CoA, ce qui contribue à la synthèse des acides gras.

La stéatose hépatique est la cause d'un déséquilibre entre une synthèse accrue des acides gras et une diminution de leurs dégradations et leurs réductions par la  $\beta$ -oxydation dans

les hépatocytes. La stéatose hépatique est de type macrovésiculaire mais plus fréquemment microvésiculaire dans la MAF (You et al., 2004) (Tiniakos, 2009) (24,43). Dans la MAF, l'exposition chronique à l'alcool induit l'activation de SREBP-1c, qui favorise la synthèse des acides gras. D'autre part, il induit également une régulation négative de PPAR alpha, entraînant une réduction du catabolisme lipidique et conduit à une accumulation de graisse dans les hépatocytes (Ji et al., 2006).

La consommation chronique d'alcool induit également l'inhibition de l'activité de l'AMPK qui induit une augmentation de l'expression de l'acétyl-CoA carboxylase impliquée dans la lipogenèse de novo (DNL) et une diminution de l'activité de la carnitine palmitolytransférase qui impliqué dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale entraînent par suite une accumulation de graisse et une stéatose (You et al., 2004).

La cirrhose est l'étape terminale de la MAF mais touche de manière très inégale les buveurs excessifs puisque seuls 10 à 20% d'entre eux seront concernés (Gao and Bataller, 2011a).

La fibrose hépatique est une réaction cicatrisante à une atteinte hépatique chronique. Elle survient après la stéatose et est associée à une inflammation hépatique induite par une exposition chronique à l'alcool. La fibrose est divisée en 4 stades (F1 à F4 selon METAVIR) selon le degré de gravité et en lien avec l'espérance de vie du patient (Lackner et al., 2017) , la cause de cette fibrose hépatique est le dépôt d'une matrice extracellulaire inappropriée par les cellules étoilées quiescentes qui se transforment en fibroblaste puis en myofibroblaste (Tsuchida and Friedman, 2017).

Lorsque la fibrose se développe progressivement jusqu'à connecté les espaces porte, on parle de cirrhose, avec tissu fibreux qui entoure des nodules de régénération hépatocytaires. Ces nodules de régénération sont composés de cellules hépatocytaires dont le

fonctionnement est altéré à cause de la déstructuration architecturale hépatique. La survenue de la cirrhose conduit à une perturbation majeure du flux sanguin hépatique par un rétrécissement des structures vasculaires dans le lobule hépatique, y compris les sinusoides (Mura, 2015). En conséquence, une hypertension portale peut survenir avec d'autres complications, notamment une ascite et des varices œsophagiennes. De plus, la fonction du foie diminue en raison de la perte d'hépatocytes fonctionnels. Le stade final de la maladie alcoolique du foie est la survenue du carcinome hépatocellulaire.

Le risque de développer une MAF est en corrélation avec la quantité d'alcool consommée d'autant plus que 90% à 100% des buveurs excessifs développent une stéatose hépatique, premier stade de la MAF. Cependant, seuls 10 à 20% de ces consommateurs développent une MAF avancée et par conséquent des facteurs supplémentaires peuvent affecter l'évolution de la pathologie. Le sexe est un facteur de risque puisque les femmes sont plus sensibles à l'alcool même à des doses plus faibles que les hommes (Becker et al., 1996). Un autre facteur de risque est une atteinte hépatique par une autre physiopathologie, comme l'infection au virus de l'hépatite C, hépatite B ou le VIH (Chen et al., 1991) (Shi et al., 2009). D'autres facteurs sont également décrits pour être des facteurs aggravants de la MAF, notamment l'obésité, le diabète, certains polymorphismes génétiques (PNPLA3, TMSF6) le tabagisme qui multiplie par trois le risque de développer une MAF et la prise de certains médicaments comme le paracétamol qui potentialise les lésions hépatiques (Naveau et al., 1997). Un phénomène assez répandu dans la société européenne chez les étudiants et les jeunes est le « binge-drinking » ou « biture express » qui consiste à consommer une grande quantité d'alcool en très peu de temps pour atteindre l'ivresse le plus vite possible. Ce comportement augmente beaucoup le risque de développer une MAF mais aussi accélère l'histoire naturelle de la maladie (Hatton et al., 2009).

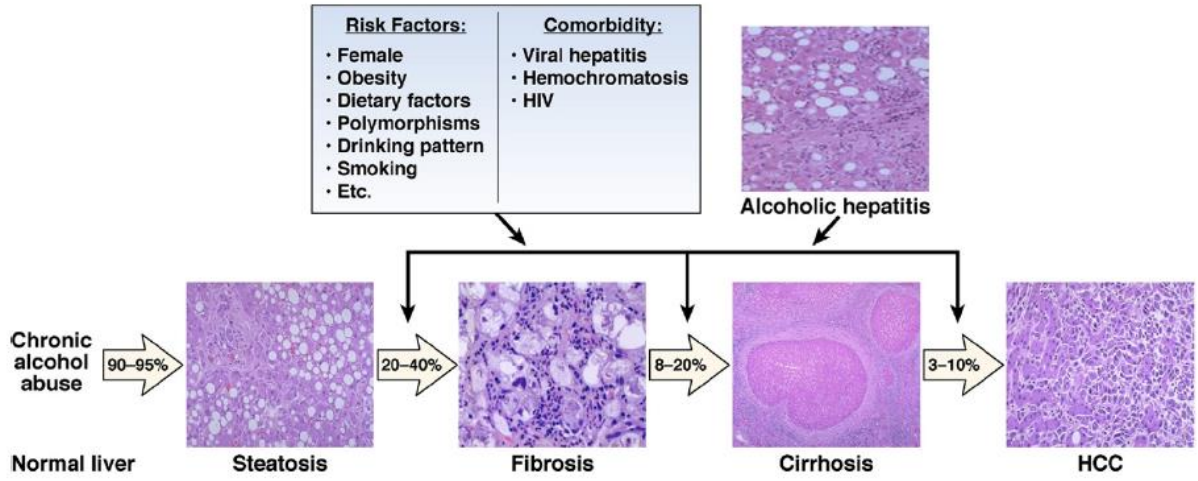


Figure 3 : Evolution de la maladie alcoolique du foie avec les facteurs de risque et de comorbidité (Gao and Bataller, 2011a)

### 2-3- L'hépatite alcoolique aigüe :

L'hépatite alcoolique (HA) est la forme la plus sévère de la MAF et peut survenir à n'importe quelle étape de l'évolution de la maladie. L'HA est accompagnée d'une inflammation qui vient se rajouter sur un foie atteint de MAF et le plus souvent à un stade de foie cirrhotique.

L'HA englobe d'une part les anomalies inflammatoires intrahépatiques retrouvées chez des patients asymptomatiques consommant de manière excessive et d'autre part les patients plus sévère qui sont symptomatiques sur le plan clinique. Il n'existe malheureusement pas d'études fiables permettant d'estimer la prévalence de l'HA. Cependant, une étude réalisée sur 1604 patients alcooliques ayant subis une biopsie du foie démontre que la prévalence était d'environ 20% (Naveau et al., 1997).

Sur le plan clinique, environ 20% des patients consommateurs excessifs d'alcool présentant des lésions histologiques d'HA restent asymptomatiques (sauf les signes liés à leur consommation excessive) (Mathurin et al., 2007).

Chez les patients HA symptomatiques, l'ictère reste le principal signe clinique (Amini, 2010). Après diagnostics différentiels écartant les autres causes possibles de décompensation hépatique aigüe (infection virale dont l'hépatite E, infections bactériennes, CHC, prise de médicaments hépatotoxiques, cirrhose sévère avec acanthocytose, transfusions itératives...) (Thursz et al., 2018), le diagnostic d'HA est alors évoqué. Les signes de décompensation de la cirrhose quand elle est présente sont aussi souvent retrouvés : ascite, une hépatomégalie, encéphalopathie hépatique ainsi que des douleurs abdominales et une perte de la masse musculaire.

Sur le plan biologique, en plus d'une élévation de la bilirubine (>50umol/L) en l'absence d'acanthocytes, on peut observer une cytolysse modérée (<300UI/L) (Crabb et al., 2016) (Lucey and Morgan, 2009). Les analyses biochimiques révèlent des taux sériques d'aspartate aminotransférase (AST) deux fois supérieur à la normale, bien que rarement supérieurs à 300 UI par millilitre, alors que les taux sériques d'alanine aminotransférase (ALT) sont plus faibles. Le rapport entre le taux d'AST et le taux d'ALT est généralement supérieur à 2, bien que ce résultat ne soit ni spécifique ni sensible (Alves et al.1979).

Chez les patients HA, le nombre de globules blancs dans le sang périphérique, le nombre de neutrophiles, le rapport international normalisé (INR, rapport entre le temps de coagulation chez le patient et le temps de coagulation normal) sont élevés. Un taux élevé de créatinine sérique, s'il est présent, est un signe inquiétant, car il présage fréquemment de l'apparition du syndrome hépatorénal ou d'une infection et est corrélé à un très mauvais pronostic estimé à 20-50% de mortalité dans les 3 mois (Lucey and Morgan, 2009).

Au vu de l'absence de spécificité clinico-biologique, la confirmation histologique est recommandée même si peu pratiquée par les autres experts (en raison de leur coût et des compétences techniques nécessaires) en comparaison aux experts français. Le diagnostic histologique est donc possible après réalisation d'une biopsie hépatique faite le plus souvent par voie transjugulaire en raison des troubles de l'hémostase et la présence d'ascite. Les signes histologiques le plus souvent retrouvés sont les suivants : présence d'un infiltrat inflammatoire à prédominance de polynucléaires neutrophiles (Altamirano et al., 2014), ballonnisation hépatocytaire, corps de mallory (inclusions cellulaires éosinophiles correspondant à des désorganisations du cytosquelette induites par l'alcool, et qui précèdent la mort cellulaire), stéatose macrovacuolaire, mégamitochondries (Thursz et al., 2018) (Figure 4).



Ces signes cliniques sont aspécifiques et doivent être corrélés aux éléments cliniques et biologiques.

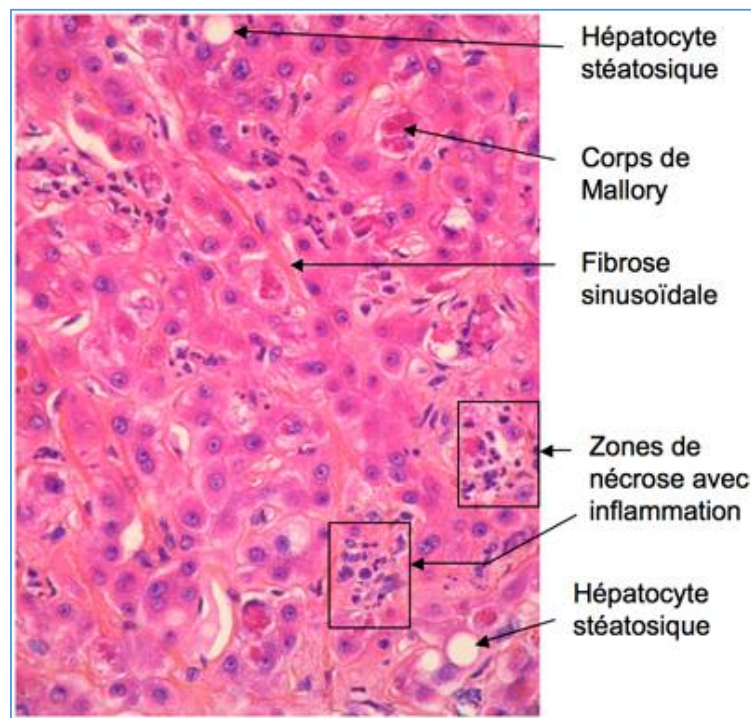


Figure 4 : représentation histologique du parenchyme hépatique d'un foie de patient atteint d'hépatite alcoolique aiguë

Le traitement de référence pour la prise en charge de l'HA est le traitement aux corticoïdes (Mathurin et al., 2002) (Louvet et al., 2018). Cependant, ce traitement présente certaines limites puisqu'environ 40% des patients HA s'avèrent être résistants au traitement et décèdent dans les mois qui suivent leurs hospitalisations, d'autant plus que ces patients s'infectent très souvent par des bactéries (*S. pneumonia*) ou des levures. Ceci induit, dans certains cas, une interruption du traitement corticoïde pour traiter l'infection par des antibiotiques (Louvet et al., 2007). Une abstinence d'alcool (nécessaire pour la survie des patients) ainsi qu'un régime nutritif adapté sont également importants dans la prise en charge du patient (Cabré et al., 2000).

En clinique, plusieurs scores permettent de prédire les patients atteints d'HA présentant un risque élevé de mortalité. Le score de Maddrey est largement utilisé comme outil clinique

pour prédire la mortalité à 30 jours et identifier les patients pouvant bénéficier d'un traitement par corticoïdes.

Le MELD score est un modèle de survie évalué sur la base de trois variables de laboratoire qui sont la créatinine sérique, la bilirubine sérique et le temps de prothrombine (Dunn et al., 2005). Des études ont montré que le score MELD peut prédire, avec précision, la mortalité à 30 et 90 jours chez les patients avec HA (Sheth et al., 2002) (Dunn et al., 2005).

Néanmoins, le score de Lille, récemment développé, comprend l'évolution du taux de bilirubine après 7 jours de traitement au corticoïde en plus des variables présentes dans le MELD score, ce qui permet de prédire la mortalité et de déterminer le profil répondeur et non répondeur au traitement par corticoïde (Louvet et al., 2007). En cas de réponse à la corticothérapie, le traitement est poursuivi pendant 28 jours au total sans décroissance, le risque de décès à 6 mois est de l'ordre de 20 %, contre 70 % chez les patients non répondeurs. Un score de Lille supérieur à 0,45 après 1 semaine de corticothérapie est associé à une mortalité de 75% à 6 mois.

La transplantation hépatique a été évaluée pour la prise en charge des patients HA corticorésistants (Mathurin et al., 2011). Classiquement, les programmes de transplantation exigeaient une durée de 6 mois d'abstinence pour les patients alcooliques afin qu'ils puissent bénéficier d'un greffon (Lucey et al., 1997). Cependant, cette durée n'est pas un bon marqueur de sevrage après transplantation hépatique pour la MAF car elle manque de spécificité et de sensibilité.....Les études réalisées par l'équipe de cliniciens de Lille ont montré que, pendant ces 6 mois d'abstinence, 75% des patients HA résistants au traitement médical décédaient et qu'une transplantation précoce et selon des critères bien précis (non-réponse au traitement médical, hépatite alcoolique sévère en tant que premier événement de décompensation hépatique, présence de membres proche de la famille pour le soutien, absence de troubles coexistants ou psychiatriques graves et accord des patients (avec l'aide du

membres de la famille) d'adhérer au traitement d'abstinence totale d'alcool tout au long de la vie.) permet de rétablir l'espérance de survie de 30% à 77% au cours de ces 6 mois (Mathurin et al., 2011).

Néanmoins, la transplantation hépatique ne peut pas être proposée comme solution thérapeutique pérenne pour diverses raisons, notamment la pénurie de greffon et l'utilisation des greffons dits limites. De même, la transplantation hépatique reste un acte chirurgical assez invasif pour les patients ; d'où la nécessité d'avancer dans la compréhension de la physiopathologie de l'HA et de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

### *2-3- L'hépatite alcoolique une physiopathologie complexe :*

L'HA est une maladie dont la physiopathologie est mal connue. Ce manque de compréhension au niveau de la pathologie est d'une part à cause d'un accès limité aux échantillons de patients qui est limité à un infime morceau de biopsie utilisé essentiellement pour le diagnostic et d'autre part à cause du manque de modèle animal capable de reproduire les caractéristiques exactes de l'hépatite alcoolique.

L'hépatite alcoolique est la conséquence de la consommation excessive d'alcool, qui implique une cascade d'événements complexes ainsi que l'interaction de diverses voies de signalisation impliquées dans des processus divers notamment l'inflammation et la régénération (Figure 5).

Au niveau intestinal, la consommation excessive d'alcool induit une destruction des cellules de Paneth, ces cellules ont un rôle important dans la production des peptides antimicrobiens, la destruction de ces cellules conduit à une expansion bactérienne au niveau intestinal (Singal et al., 2016) et une translocation de lipopolysaccharide (LPS) en direction du foie par la veine porte.

Au niveau hépatique, le LPS est capable de stimuler les récepteurs TLR4 des macrophages et d'induire par la suite une cascade de signalisations impliquées dans l'inflammation (Keshavarzian et al., 2009) (Mutlu et al., 2012). L'inflammation est d'autant plus exacerbée au niveau hépatique à cause de la métabolisation de l'alcool en produit toxiques par les hépatocytes (via le CYP3A4). Au final, la rémission des patients HA va être fortement liée à l'équilibre qui va survenir entre le processus de régénération hépatique et le processus d'inflammation qui va induire de la nécrose et de l'apoptoses cellulaires (Singal et al., 2018).

Au cours de la survenue de l'épisode inflammatoire chez les patients HA, nous retrouvons une augmentation de l'expression du TNF- $\alpha$  qui va induire une surexpression des espèces de réactives de l'oxygène (ROS) au niveau mitochondrial hépatocytaire qui aura comme conséquence un déficit en antioxydant comme le glutathion et une apoptose et nécrose cellulaire (Neuman et al., 1998) (Yin et al., 1999).

Cependant, l'activation du processus inflammatoire reste une étape cruciale vers la régénération, les cellules de Kupffer activées se mettent à sécréter des facteurs essentiels à la régénération hépatocytaire notamment la production des cytokines hépatoprotectrices (telles que l'IL-6) et des cytokines anti-inflammatoires (telles que l'IL-10) ainsi que d'autres chimiokines impliqués dans le recrutement des PNN comme l'IL-22, l'IL-8 et l'INF $\gamma$  (Singal et al., 2016) (Gao and Bataller, 2011b). De même, au niveau hépatique, chez les patients HA, nous retrouvons également un recrutement des cellules du système immunitaire adaptatif comme les lymphocytes T CD4 $^{+}$  et les lymphocytes T CD8 $^{+}$  et les lymphocyte B LB très probablement activés à la suite de la réponse immunitaire innée ; cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer l'implication du système immunitaire adaptatif dans les processus d'inflammation et de régénération dans l'HA (Gao and Bataller, 2011b).

Les cellules étoilées, présentes au niveau hépatique, sont activées au cours de l'inflammation, notamment par le biais des cellules de Kupffer, du LPS bactériens et de l'acétaldéhyde (Singal et al., 2018), leur activation induit par la suite la formation de la fibrose. L'activation des cellules étoilées en myofibroblaste va induire un changement dans la composition de la matrice extracellulaire (ECM) qui devient plus collagénique et induit une hypertension portale via la diminution de l'expression du monoxyde d'azote synthétase des cellules endothéliales (eNOS).

D'autre part, les cellules Natural Killer ont comme mission de protéger le foie contre la fibrose par le biais de l'activation des TRAIL et de l'IFN $\gamma$ . Or, l'éthanol entraîne, chez les patients HA, une diminution de l'activité anti-fibrosante des NK (Shipley et al., 2019).

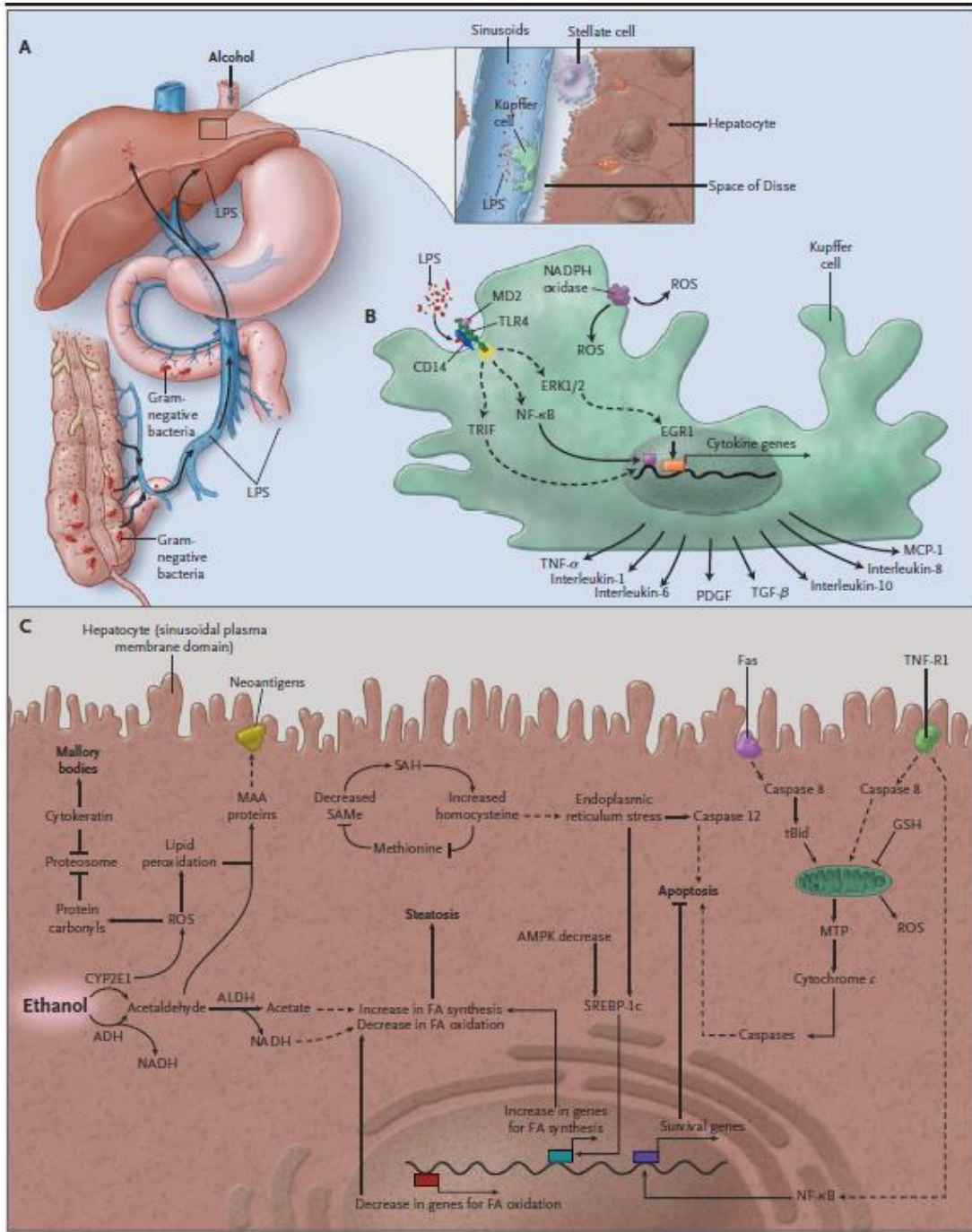


Figure 5 : Aspects complexes de la physiopathologie des lésions hépatiques induites par l'alcool (Luicy and Morgan, 2009).

### 3- Le polynucléaire neutrophile (PNN) :

Le PNN est un acteur majeur du système immunitaire qui intervient en première ligne dans la défense contre les agents pathogènes dans l'organisme. Ces cellules sont recrutées de la circulation sanguine au foyer infectieux et exerce des fonctions multiples pour lutter contre les pathogènes.

Le paradoxe existant dans l'HA caractérisé par une augmentation du nombre de PNN au niveau systémique, laisse penser à une meilleure réponse immunitaire qui pourrait limiter les épisodes infectieux. Or, les infections bactériennes sont l'un des principaux facteurs de l'augmentation du risque de mortalité dans les cas graves d'AH. On estime que 25% des patients atteints d'HA sévère sont infectés au moment du diagnostic et que 25% développeront une infection au cours d'un traitement par corticostéroïdes (Louvet et al., 2009). Chez les patients atteints d'hépatite alcoolique aiguë, il existe une forte concentration en polynucléaires neutrophiles dans le foie. Le rôle et la fonction de cette cellule dans l'HA sont mal connus (Lucey et al., 2009).

#### 3-1- Le neutrophile et sa fonction :

Les neutrophiles sont des cellules du système hématopoïétique qui mûrissent dans la moelle osseuse dans un processus appelé granulopoïèse. Une fois maturés, ils quittent la moelle osseuse et entrent dans la circulation où ils constituent les globules blancs les plus abondants (Liew and Kubes, 2019a).

Les neutrophiles constituent un important sous-groupe de cellules immunitaires innées impliquées dans la première ligne de défense contre les infections. Les conditions associées à

la neutropénie révèlent que ces cellules sont indispensables pour lutter contre les infections bactériennes et fongiques (Liew and Kubes, 2019a).

Les neutrophiles, également appelés granulocytes neutrophiles, sont des cellules phagocytaires qui jouent un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les infections microbiennes et sont parmi les premières cellules à être recrutées sur un site d'infection. En plus de leur puissante activité antimicrobienne, les neutrophiles peuvent contribuer à des effets indésirables importants au niveau hépatique au cours de l'inflammation (Ramaiah and Jaeschke, 2007) (Peng et al., 2018).

Il existe une grande différence dans le nombre de neutrophile périphérique circulant entre l'humain et la souris différent. Chez l'homme, 50 à 70% des leucocytes en circulation sont des neutrophiles, contre 10 à 25% chez la souris (Doeing et al., 2003) (Mestas and Hughes, 2004).

Les neutrophiles sont des leucocytes polymorphonucléaires et phagocytaires qui constituent la première ligne de la réponse immunitaire de l'hôte contre les agents pathogènes envahissants (Nathan, 2006). Ce sont également des cellules effectrices importantes lors d'une inflammation induite par une lésion tissulaire (Weiss, 1989). Les neutrophiles ont une puissance et une efficacité élevées pour lutter contre les infections microbiennes, et les personnes présentant une neutropénie sont plus susceptibles aux infections microbiennes et fongiques (Tak et al., 2017).

Les infections et leurs mécanismes inflammatoires associés s'accompagnent d'un afflux rapide de neutrophiles du sang périphérique au site inflammatoire. Le recrutement des PNN a pour fonction d'éliminer les micro-organismes et les infections par divers mécanismes, dont le chimiotaxie, la phagocytose, la libération d'espèces réactives de l'oxygène et de protéines granulaires, ainsi que la production et la libération de cytokines (Selders et al., 2017) (Hellebrekers et al., 2018). Outre ces mécanismes bien établis, plusieurs rapports ont



démontré l'importance des pièges extracellulaires à neutrophiles (TNE) dans ce processus. Outre le rôle central des neutrophiles dans l'immunité innée, un grand nombre de preuves a montré l'importance des neutrophiles dans la modulation de la réponse immunitaire adaptative (Leliefeld et al., 2015) .

Les neutrophiles ont longtemps été considérés comme une population homogène avec un phénotype et une fonction conservés, cependant, de nos jours plusieurs études récentes ont démontré la présence d'une hétérogénéité de population de PNN avec l'identification de différents phénotypes fonctionnels notamment dans le cancer et l'inflammation (Hong, 2017) (Silvestre-Roig et al., 2016). Les neutrophiles présentent un spectre de phénotypes d'états fonctionnels caractérisés par l'expression d'un large éventail de récepteurs au niveau de leurs surfaces cellulaires. Ces phénotypes semblent s'adapter rapidement aux changements de signaux environnementaux (Pillay et al., 2007) et les profils d'expression des récepteurs de neutrophiles peuvent refléter le type et la gravité de la réponse inflammatoire une atteinte (Pillay et al., 2007). Étant donné que les neutrophiles sont les principales cellules effectrices au cours de la réponse inflammatoire systémique, le sous-phénotypage des neutrophiles peut à la fois éclairer les mécanismes de la maladie.

### *3-2- Recrutement et activation du neutrophile :*

Au cours de l'inflammation, le recrutement des leucocytes dans les veinules post-capillaires dans la plupart des tissus, suit généralement une voie en plusieurs étapes : attache, roulement, adhésion, rampement et finalement transmigration (Figure 6).

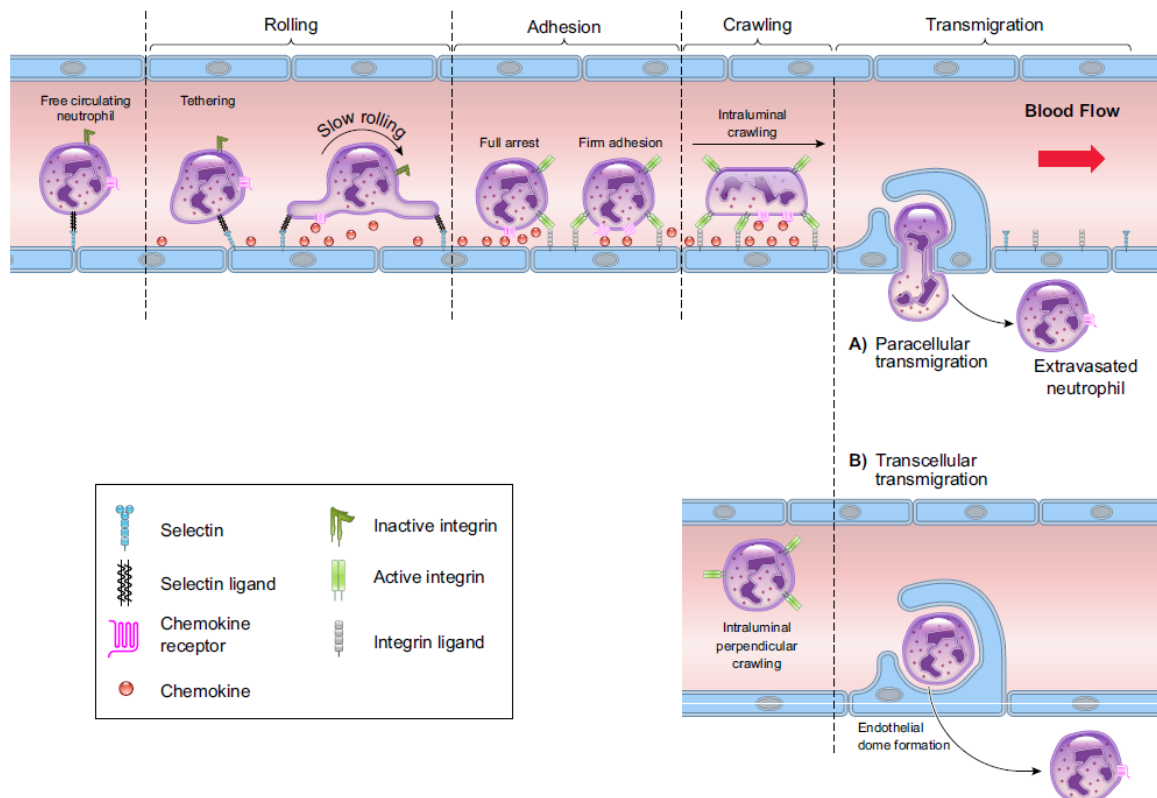


Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes du processus du recrutement du PNN (Liew and Kubes, 2019b)

La cascade initiale de recrutement des neutrophiles est déclenchée par des modifications à la surface des cellules endothéliales résultant de la sécrétion de médiateurs inflammatoires telque certaine cytokine qui sont libérées par des leucocytes résidant dans le tissu qui rencontrent des agents pathogènes (Ley et al., 2007) (Phillipson and Kubes, 2011) (Sadik et al., 2011).

De plus, les cellules endothéliales peuvent également être directement activées par le biais de récepteurs de reconnaissance de formes (PRR) comme NOD1 et NOD2 qui détectent les agents pathogènes. L'activation des cellules endothéliales induit une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion qui sont la E-sélectine et la P-sélectine en quelque minutes (Petri et al., 2008) (Phillipson and Kubes, 2011). Les neutrophiles expriment de manière constitutive les ligands glycosylés correspondants au sélectine tels que le ligand 1 de glycoprotéine de P-sélectine (PSGL-1). La fixation des ligands PSGL-1 au sélectine conduit à

l'attachement des neutrophiles à la couche de cellules endothéliales. La connexion est suivie d'un roulement le long de la direction du flux sanguin (Phillipson and Kubes, 2011) (Zarbock et al., 2011).

Pour les neutrophiles, certaines chimiokines comportant un motif glutamate-leucine-arginine avant le motif CXC amino-terminal qui sont important dans l'activation du neutrophile (Sadik et al., 2011) (Sanz and Kubes, 2012). Parmi ces chimiokine activatrice du PNN, le CXCL8 (connue sous le nom d'IL-8 chez l'homme), son analogue chez la souris : CXCL1 (kératinocytérivée (KC), CXCL2 et CXCL5 (Sadik et al., 2011) (Sanz and Kubes, 2012). Toutes ces chimiokines signalent via le récepteur CXCR2 à la surface du PNN (Pruenster et al., 2009) (Williams et al., 2011). L'activation de CXCR2 enclenche des voies de signalisation au sein du PNN qui résulte dans la modification conformationnel de certaine intégrines à la surface de la cellules (Abram and Lowell, 2009). Les intégrines notamment CD11a et CD11b passent d'une conformation d'affinité faible à élevée, ce qui leur permet de se lier fortement au molécules d'adhésion ICAM1 et VCAM au niveau des cellules endothéliales activé (Yang et al., 2005).

Les neutrophiles migrent à travers la barrière des cellules endothéliales de deux manières : par une voie paracellulaire ou par une voie transcellulaire. La plupart des transmigrations se font par voie paracellulaire, bien que la voie transcellulaire soit favorisée lorsque l'expression endothéliale de la molécule d'adhésion intracellulaire (ICAM) -1 est élevée (Yang et al., 2005).

La migration paracellulaire dépend de la formation de dômes de cellules endothéliales, qui sont des protubérances membranaires riches en molécules d'adhésion notamment ICAM-1, ICAM2 et VCAM-1 qui s'étendent de la cellule endothéliale pour aller entourer le neutrophile (Phillipson et al., 2008) (Barreiro et al., 2002) (Petri et al., 2008). Les molécules d'adhésion endothéliales interagissent avec les intégrines des neutrophiles, notamment LFA-1 pour

former un joint étanche dans le dôme (Shaw et al., 2004). Les étapes réelles de la transmigration par les voies paracellulaire et transcellulaire dépendent d'interactions homophiles entre des molécules d'adhésion supplémentaires, telles que PECAM-1 et CD99, qui sont exprimées à la fois au niveau membranaire du PNN et de la cellule endothéliale (Muller, 2013).

Les protéines de jonction endothéliales jouent également un rôle dans la médiation de la migration paracellulaire des neutrophiles. Parmi ces protéines de jonctions, les molécules de JAM (JAM-A, JAM-B ou JAM-C-) trouvées dans les jonctions serrées des cellules endothéliales forment des interactions avec les intégrines du PNN (Mamdouh et al., 2009) (Nourshargh et al., 2006). Au cours de l'inflammation, ces molécules sont perturbées et sont redistribuées à la surface apicale des cellules endothéliales (Orlova et al., 2006). En conséquence, l'intégrité et la fonctionnalité de la barrière endothéliale est affectées et favorise l'adhésion luminal des neutrophiles (Woodfin et al., 2009). Une fois la transmigration terminée, le PNN rejoint le lieu d'infection pour lutter contre les pathogènes (Peng et al., 2018).

### *3-3- Le rôle du neutrophile au cours de l'atteinte hépatique :*

D'une façon paradoxale, outre l'effet protecteur du PNN par ces différentes fonctions protectrices décrites plus haut, ces cellules sont également capables d'induire des lésions tissulaires dans plusieurs physiopathologies hépatiques.

Les neutrophiles jouent un rôle critique dans certaines maladies hépatiques. Plusieurs études ont permis d'identifier l'implication du PNN dans les pathologies hépatiques, notamment dans les processus d'ischémie / reperfusion hépatique, au cours de l'atteinte virale hépatique, de la NASH ou la NAFLD, de la cirrhose, de l'insuffisance hépatique, dans l'HA et dans le CHC. Il faut préciser que les mécanismes d'action du PNN sont différents d'une

pathologie à une autre, et sont spécifiques du contexte de l'atteinte hépatique (Xu et al., 2014).

### **Le PNN dans l'Ischemie reperfusion (IR) :**

Le PNN est le principal acteur responsable des lésions tissulaires au cours de l'IR. Durant la reperfusion, les PNN sont rapidement recrutés dans le foie pour éliminer les hépatocytes en souffrance. Le recrutement des PNN au niveau hépatique est médié essentiellement par l'expression des agents chimiotactiques du système du complément C3a et C5a en réponse à la reperfusion (Jaeschke et al., 1993a).

L'activation des cellules de Kupffer au niveau hépatique induit l'expression de chimiokines attractante du PNN notamment le CXCL1 et le CXCL8 créent ainsi un gradient chimioattractant du PNN au niveau des sinusoides hépatiques et favorisant leurs interactions avec les cellules endothélial (Sarris et al., 2012) (Jaeschke et al., 1993b). Une fois la transmigration du PNN au niveau hépatique est terminé, les PNN répondent au signaux inflammatoires qui sont essentiellement l'HMBG-1 et l'ADN libéré par les hépatocytes endommagés (Huang et al., 2015). L'ADN libéré des hépatocytes endommagé induit l'activation du TLR9 au niveau du PNN qui induit une surproduction de ROS et la sécrétion de chimiokines via la voie NF- $\kappa$ B (Bamboot et al., 2010). L'activation du TLR9 à la surface du PNN conduit à leurs dégranulation et amplifie par la suite les lésions tissulaires au cours de l'IR (Miyake and Onji, 2013).

Les lésions tissulaires en cours exacerbent le recrutement, la migration et l'infiltration des neutrophiles. Cette infiltration est favorisée par la libération ultérieure de signaux de lésion tissulaire, tels que les DAMPS, l'ADN, les chimiokines et cytokines (Oliveira et al., 2018).

### 3-4- Le PNN dans l'hépatite alcoolique :

L'hépatite alcoolique est caractérisée, sur le plan histologique, par un important infiltrat de polynucléaires neutrophiles (PNN) dans le parenchyme hépatique. Des données de la littérature démontrent, dans certains modèles murins d'alcoolisation chronique, quelques signes d'augmentation du nombre de PNN au niveau hépatique et au niveau systémique (Bertola et al., 2013), ces données sont également retrouvées chez les patients alcooliques (Li et al., 2017). Cependant, le rôle pathogénique de l'infiltration du neutrophile dans l'HA reste aujourd'hui une question non résolue.

De nos jours, le rôle pathogénique des PNN reste très discuté dans la littérature. Dans l'HA, on pense qu'ils infiltrent le foie au cours de l'atteinte hépatique et ainsi agressent les hépatocytes. En effet, au cours de l'HA, nous observons une augmentation de l'expression de chimiokines et cytokines attirant et activant les PNN comme l'IL8, l'IL1 $\beta$ , et l'IL17. Les chimiokines CXCL1 et CXCL5 sont d'ailleurs en corrélation avec la gravité de la pathologie (Gao et al., 2019).

A l'inverse, nous retrouvons des arguments en faveur d'une amélioration des lésions et un meilleur pronostic des patients HA en présence d'infiltrat de PNN. Une étude récente a montré que la présence de PNN dans le foie des ces patients était associée à une amélioration de la régénération hépatique à travers la sécrétion de facteurs de croissance et la lutte contre l'infection bactérienne (Altamirano et al., 2014).

Des données de la littérature montrent que le PNN de patients HA présente une défaillance dans les fonctions de phagocytose et anti-bactériennes (Stadlbauer et al., 2009), entraînant un échec de la lutte contre l'infection et une augmentation de l'expression des cytokines et chimiokines inflammatoires. Dans le laboratoire, nous avons principalement

contaté un défaut au nivea de la migration de ces PNN, sans retrouver ce dysfonctionnement dans la phagocytose et le Bust.

## 4- La régénération hépatique :

La régénération hépatique est un processus physiologique qui intervient au cours de lésion hépatique pour rétablir un équilibre homeostatique. La régénération hépatique fait intervenir deux types de processus régénératifs. Le premier processus le plus classique est la réplication hépatocytaire qui intervient au cours de différentes lésions hépatiques notamment après hépatectomie. Le deuxième processus implique des cellules bipotentes (capable de donner des hépatocytes ou des cholangiocytes) nommées progéniteur hépatique (HPC) qui intervient dans le cas où le premier processus de régénération impliquant la réplication hépatocytaire est déficient ou insuffisant pour rétablir l'homeostasie hépatique.

Outre l'aspect inflammatoire décrit dans l'HA et sur laquelle sont focalisés la majorité des perspectives thérapeutiques, notre équipe a démontré un profond défaut de régénération hépatique. Dans ce chapitre, je vais détailler les mécanismes de régénération hépatique et décrire le défaut de régénération dans l'HA.

### 4-1- Historique de la régénération du foie :

La régénération hépatique est un processus complexe dont l'histoire est compliquée à retracer. Cependant, le mythe de Prométhée suggère que les Grecs anciens connaissaient déjà la capacité du foie à se régénérer.

Ce n'est qu'au début du XVIII<sup>ème</sup> siècle qu'on commence à obtenir des pratiques de résection hépatique sur des militaires blessés pendant la guerre (Fortner and Blumgart, 2001). A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, et suite aux progrès médicaux sur les techniques d'anesthésie et d'asepsie, les études sur la régénération hépatique évoluent avec des expérimentations animales (Li, 1999) suivies par la description du protocole d'hépatectomie partielle par HIGGINS et ANDERSON, utilisé encore de nos jours avec quelques modifications (Higgins et al., 1931). Depuis, nos connaissances et l'évolution technologique en matière d'analyse en



biologie moléculaire ont permis de mieux comprendre les aspects mécanistiques de la régénération du foie. Cependant, beaucoup reste à faire pour comprendre complètement et maîtriser ce processus complexe dans le but de l'utiliser dans la médecine régénérative.

#### 4-2- Les acteurs de la régénération hépatique :

La régénération est un processus complexe qui a pour but de recréer l'architecture et la fonction des tissus d'origine à la suite de lésions sans laisser de cicatrices (Gurtner et al., 2008). Loin d'être artificiel, son mécanisme est très présent dans la nature, mais il varie considérablement d'une espèce à une autre et avec l'âge (Timchenko, 2009). Le processus de régénération chez les mammifères est remarquable avec une capacité régénérative très importante au cours du développement prénatal, mais qui diminue à l'âge adulte.

Le foie est quasiment le seul organe du corps humain capable de se régénérer (Michalopoulos, 2014). La compréhension des mécanismes responsables de la régénération du foie peut aider les patients nécessitant une résection hépatique importante ou une greffe, et peut être appliquée au domaine de la médecine régénérative. D'autant plus que la pénurie d'organes de donneurs, une faible capacité de régénération et une probabilité élevée de récurrence rendent ces options improbables pour la plupart des patients, ce qui démontre la nécessité d'alternatives prometteuses dans la recherche de cible thérapeutique pour favoriser la régénération hépatique.

L'homéostasie des tissus épithéliaux à fort renouvellement comme l'intestin et la peau est essentiellement basée sur la différenciation des cellules souches.

Cependant, dans le foie, le taux de renouvellement est faible, la régénération hépatique est essentiellement médiée par la division des hépatocytes matures (Michalopoulos, 2017). La plupart des connaissances en matière de régénération du foie proviennent de modèle murin, le

modèle consiste à effectuer une hépatectomie partielle (PHx) avec 66% de résection pour garder 34% soit 1/3 de la masse hépatique saine (Gilgenkrantz and Collin de l'Hortet, 2011). Suite à la PHx, la régénération est essentiellement médiée par les hépatocytes résidents qui rentrent dans le cycle cellulaire et prolifèrent pour rétablir l'homéostasie hépatique.

Dans le contexte de maladies hépatiques chroniques, la régénération est perturbée, voire bloquée. Cela aboutit à une réaction ductulaire au cours de laquelle des cellules bipotentes nommées cellules progénitrices du foie (HPCs) prolifèrent dans la région périportale pour se différencier en cellules hépatocytaires et par suite rétablir l'équilibre et la fonctionnalité hépatique. Bien que ces HPCs aient la capacité de se différencier *in vitro* en hépatocytes et en cellules biliaires, leur capacité à participer à la régénération du foie est loin d'être claire. Leur expansion a même été associée à une fibrose accrue et à un pronostic plus sombre dans les maladies chroniques du foie.

Des controverses subsistent également : des études de lignage dans des modèles expérimentaux de lésions chroniques chez la souris ont récemment suggéré que ces HPCs provenaient de la dédifférenciation des hépatocytes, alors que dans d'autres situations ils semblaient provenir des cholangiocytes.

#### *4-3- Régénération médiée par les hépatocytes :*

La régénération hépatique médiée par les hépatocytes est réalisée en plusieurs phases, chaque phase est orchestrée par le relargage de cytokine et l'expression de facteur de croissance suivit de l'expression d'inhibiteurs de prolifération en fin de régénération.

La régénération hépatocyttaire débute par la phase d'initiation ou d'induction suivie de la phase de prolifération et se termine par la phase de terminaison (Figure 6).

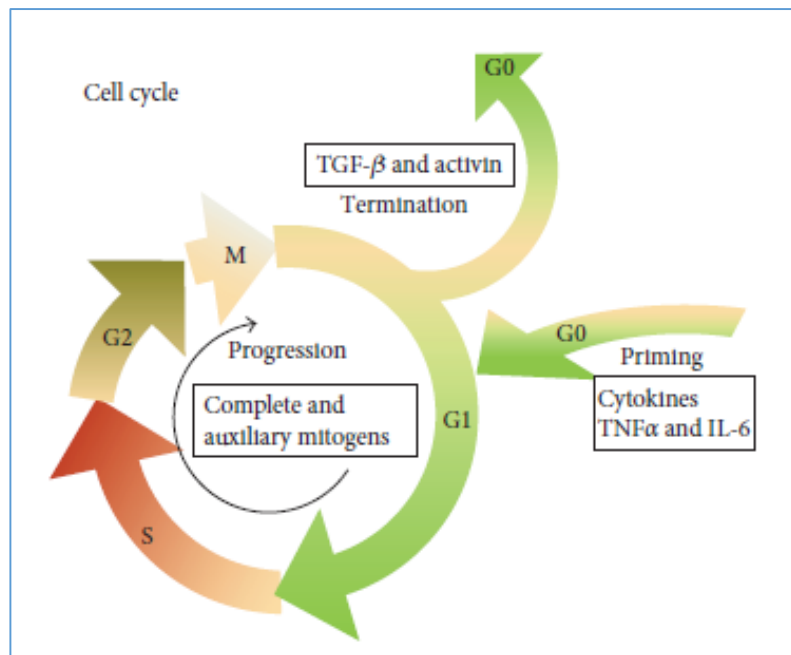


Figure 7 : les différentes phases de la régénération hépatocytaires (Tao et al., 2017).

#### 4-3-1 La phase d'initiation :

La phase d'initiation des hépatocytes est essentielle pour lancer les hépatocytes dans leur cycle cellulaire pour passer du stade G0 en phase G1.

Suite à une atteinte hépatique caractérisée par une mort cellulaire, le processus d'inflammation joue un rôle majeur dans le recrutement et la prolifération de cellules immunitaires essentielles pour l'initiation de l'hépatocytes à proliférer, par la suite ce processus inflammatoire joue un rôle indiscutable tout au long du processus de régénération. L'inflammation participe à la régénération en induisant l'expression de cytokine et des facteurs de croissance par le biais des cellules immunitaires. Les cytokines les plus connues et les plus étudiées sont les cytokines pro-inflammatoire TNF $\alpha$  et IL6 (Blindenbacher et al., 2003) (Webber et al., 1998).

Les macrophages résidants du foie, nommés cellules de Küppfer, sont bien connus pour leur rôle de production d'un certain nombre de cytokines et d'immunomodulateurs ayant des

effets directs sur la régénération du foie. Les cellules de Küppfer sont la source majeure de TNF $\alpha$  et d'IL6 dont l'expression est induite par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. La translocation bactérienne provenant de l'intestin en direction du foie est riche en lipopolysaccharides (LPS), ce composant de la paroi des bactéries Gram- est un ligand activateur du toll-like receptor4 (TLR4) qui va induire le déclenchement de la cascade de signalisation NF- $\kappa$ B. La présence du LPS dans le foie induit également l'activation du système du complément dont les sous unités C3a et C5a sont capables d'induire l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Strey et al., 2003). L'enclenchement de la voie NF- $\kappa$ B par ces facteurs est crucial dans l'initiation de l'hépatocyte pour rentrer dans le cycle cellulaire, et la perte d'expression du TNF $\alpha$  et de l'IL6 perturbe, voire interrompt totalement le processus de régénération.

La fixation du LPS sur son récepteur TLR4 induit l'activation et le recrutement du facteur de différenciation myéloïde 88 (MyD88), déclenchant par la suite la transduction du signal en aval afin de favoriser la libération des facteurs pro-inflammatoires. L'IL6 peut être exprimée d'une façon dépendante ou indépendante du TNF $\alpha$  dans le foie. Durant une atteinte hépatique, une phase aigüe de réponse est médiée par l'IL6 qui a des capacités cytoprotectrices et mitogéniques. L'IL6 se fixe sur son récepteur (IL6R) puis le complexe formé IL6/IL6R se lie à un corécepteur glycoprotéine 130 (gp130), cette liaison n'est réalisée qu'en présence du complexe et ne s'effectue pas en présence de l'IL6 ou de son récepteur seul, conduisant à l'activation de la cascade de signalisation JAK/STAT, MAPK et PI3K/AKT (Schaper and Rose-John, 2015).

La voie de signalisation STAT3 est capable d'induire l'expression de suppresseur SOCS pour réprimer l'activité des voies de signalisation de cytokine. Cette répression est importante

pour réguler l'expression de certaines cytokines mais a également un effet inhibiteur sur l'expression de la gp130 (Schaper and Rose-John, 2015).

Bien que la gp130 soit présente dans presque toutes les cellules, l'IL-6R n'est exprimé que dans certains types cellulaires. Dans le foie, les hépatocytes sont quasiment les seules cellules à avoir ce récepteur et par la suite l'effet induit par l'IL6 semble être limité à ce type cellulaire.

L'augmentation du taux d'IL6 a été rapportée, dans une ancienne étude, comme étant corrélée à la sévérité de la maladie durant la MAF (Hill et al., 1992). Cependant, de nombreuses études réalisées sur des modèles murins ont démontré que l'IL6 avait un effet hépatoprotecteur vis à vis des lésions induites par l'alcool. Les souris déficientes en IL6 développés plus de lésions hépatiques ainsi que de la stéatose sous régimes riche en alcool (El-Assal et al., 2004) (Hong et al., 2002) tandis que d'autres études in-vivo ont montré que le traitement des souris avec de l'IL6 conduisait à une diminution de la stéatose hépatique sous régimes alcool (Fukumura et al., 2007) (Hong et al., 2004). Ces données suggèrent que l'augmentation des taux d'IL6 au cours des stades précoces de la MAF serait induite dans le but de prévenir les dommages hépatocellulaires.

STAT3 est un signal de survie cellulaires, plusieurs études utilisant des modèles murins de lésion hépatique ont mis en évidence son rôle hépatoprotecteur (Gao, 2005) (Horiguchi et al., 2010). La fixation de l'IL6 sur son récepteur conduit à l'activation de STAT3. Les souris déficientes en IL6 avaient un taux de mortalité très élevés et une inactivation de STAT3 après hépatectomie à cause du manque de prolifération hépatocytaires. Un traitement à l'IL6 à ces souris déficientes été capable de rétablir l'activation de STAT3 et par la suite la prolifération hépatocytaire et de diminuer les lésions hépatiques (Cressman et al., 1996).

4-3-2- La phase de prolifération :

La seconde phase est la phase de prolifération, comme déjà discuté, la phase d'initiation est largement dépendante de l'expression de certaines cytokines. La phase de prolifération quant à elle, nécessite l'expression de facteurs de croissances indispensable pour passer le cycle cellulaire des hépatocytes de la phase G1 au stade S.

Les hépatocytes, ainsi en début de phase G1, deviennent sensibles aux facteurs mitogéniques dont les plus connus sont l'HGF, l'EGF et le TGF-alpha. La fixation de ces facteurs de croissance sur leurs récepteurs va induire l'activation de l'expression des gènes impliqués dans de nombreuses voies de signalisation importantes pour la prolifération de l'hépatocyte. Au cours de cette phase, la sous-unité du récepteur gp130 est impliquée dans la production en aval des cyclines nécessaires à la progression dans le cycle cellulaire dont les cyclines D, E et A ainsi que la formation des complexes cdk4 / cyclinD et cdk2 / cycline E (Menjo et al., 1998) (Albrecht et al., 1993). La formation des complexes cdk4/cyclinD et les complexes cdk6/cycline E induisent la phosphorylation de la protéine Rb (rétinoblastome protéine). La phosphorylation de Rb va conduire à l'expression des facteurs de transcriptions E2F qui ont pour rôle de contrôler l'expression de gènes nécessaires pour la transition G1/S.

Le facteur de croissance épidermique (EGF) et le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) sont des facteurs de croissance importants lors de la régénération du foie (Michalopoulos and Khan, 2005).

Le HGF est produit par les cellules étoilées et agit de manière paracrine et endocrine sur les hépatocytes. Le pro-HGF, précurseur de l'HGF, est activé par clivage protéolytique au niveau du site Arg-Val-Val dans la matrice extracellulaire par l'urokinase-type plasminogène activator (uPA) (Shimizu et al., 2001). La fixation de l'HGF sur son récepteur c-met induit l'activation de la voie de signalisation ERK1/2, cette activation via l'HGF de ERK1/2 est essentielle pour la régénération du foie en activant la prolifération des hépatocytes *in vitro* et la réplication de l'ADN *in vivo* (Huh et al., 2004) (Borowiak et al., 2004). D'autres études

suggèrent également un rôle hépatoprotecteur de l'HGF qui régulerait des kinases impliquées dans la survie cellulaire comme PI3K et AKT (Ozaki et al., 2003). L'inactivation du gène c-met, récepteur de l'HGF dans un modèle murin induit une hypersensibilité à l'apoptose via l'activation de la voie Fas induisant ainsi une perturbation de régénération suite aux lésions hépatiques (Huh et al., 2004).

Il existe également d'autres facteurs mitogéniques appartenant à la famille mitogéniques de l'hépatocytes et ont pour cible l'EGFR comme récepteur. Parmi ces ligands, on retrouve essentiellement l'EGF, le TGF-alpha et l'heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) et l'amphiregulin (AR). Ces différents ligands ont des fonctions différentes mais souvent complémentaires. La provenance de ces ligands est variée, l'EGF est produit par la glande de Brunner dans le duodénum (Skov Olsen et al., 1988) tandis que le TNF-alpha à action autocrine est plutôt produit par l'hépatocyte lui-même (Mead and Fausto, 1989).

#### 4-3-3-La phase de terminaison :

Lorsque le ratio masse hépatique / masse corporelle a été restauré la régénération hépatique s'interrompt.

Le processus de terminaison implique l'inhibition de la prolifération hépatocytaire essentiellement par le biais du transforming growth factor beta « TGF $\beta$  » et l'expression de certaines cytokines et facteurs de croissance.

Les inhibiteurs de la signalisation des cytokines (SOCS) sont des régulateurs négatifs de la cascade de signalisation des cytokines. L'expression de l'IL6 va induire l'expression de SOCS3 qui va inhiber la phosphorylation de STAT3 (Campbell et al., 2001). Cette boucle de rétrocontrôle négative induit en contrepartie une inhibition de l'IL6, ceci expliquerait pourquoi une surexpression en IL6 peut entraîner une augmentation des lésions hépatiques et une altération de la croissance cellulaire après une hépatectomie partielle (Wüstefeld et al.,

2000). Un KO spécifique de SOCS3 au niveau hépatocytaire induit une hyperprolifération de ces derniers, ce qui suggère que cette protéine est importante pour contrôler la réponse proliférative normale des hépatocytes (Riehle et al., 2008).

L'activation des voies de signalisation de l'HGF et du EGF induit l'expression d'un facteur antiprolifératif produit par les cellules étoilées nommé le TGF $\beta$  (Derynck and Zhang, 2003) (Michalopoulos et al., 2001).

Au cours des premières 48 heures post hépatectomie, nous observons une augmentation TGF $\beta$  qui est contrée par une diminution de l'expression de son récepteur TGF $\beta$ R au niveau hépatocytaire (Chart et al., 1995).

Les activines et les protéines morphogénétiques osseuses (BMP), sont des membres de la famille du TGF $\beta$  et sont impliquées dans de nombreux mécanismes biologiques, y compris la régénération hépatique. Douze heures post-hépatectomie partielle, l'expression de l'activine A est augmentée pour réguler négativement la régénération hépatique par inhibition de la prolifération hépatocytaire et l'apoptose de ces dernières *in vitro* et *in vivo* (Takamura et al., 2005) (Chen et al., 2014). L'activine A a également pour effet de réguler la composition de la matrice extracellulaire en induisant la production de fibronectine essentielle à la régénération hépatique (Date et al., 2000).

Au final, la phase de terminaison reste, jusqu'à aujourd'hui, un processus complexe pour lequel des travaux supplémentaires sont nécessaires.

#### 4-4- La régénération médiée par les HPC

Les cellules souches hépatiques ou cellules progénitrices hépatiques « HPCs », sont des cellules bipotentes capables de se différencier en hépatocytes ou en cholangiocyte. Si



l'atteinte hépatique est très importante, et le processus de régénération médié par les hépatocytes est incapable de rétablir l'équilibre physiologique du foie avec une perte importante d'hépatocytes induit par l'agression, les HPCs se différencient en hépatocytes pour essayer de rétablir un équilibre de régénération en fonction de la perte cellulaire. Cependant, nous retrouvons contradictions et incertitudes.

Les résultats de recherche sur les cellules souches hépatiques ont donné des résultats contradictoires, générant de multiples théories non concluantes (Michalopoulos and Khan, 2015). Contrairement à certains organes, tels que les muscles squelettiques (Aziz et al., 2012) et les follicules pileux (Cotsarelis et al., 1990), il n'existe pas de compartiment de cellules souches reconnaissable dans le foie.

Cependant, la plupart des données de la littérature suggèrent la présence de ces cellules bipotentes au niveau des canaux biliaires du canal de Herring (Gouw et al., 2011) (Figure 7). Cependant, diverses expériences de traçage de lignées de souris contredisent cette théorie.

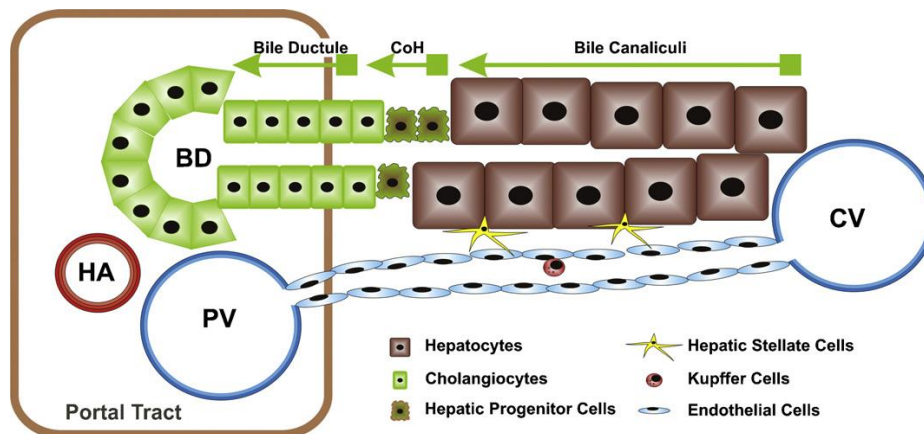


Figure 8 : Emplacement des progéniteurs hépatique dans le foie

Les cellules progénitrices sont situées dans les canaux de Hering et représentent la connexion entre les canalicules biliaires et les systèmes biliaires.

#### 4-4-1- Marqueur des HPC :

De nos jours, aucun marqueur spécifique des HPCs n'a été décrit. La détection et la caractérisation de ces cellules sont principalement basées sur la co-expression de marqueurs biliaire, hépatocytaire et souche en même temps.

En dépit de leurs caractéristiques et de leurs origines potentiellement différentes en fonction de la maladie, divers marqueurs communs ont été décrit pour identifier un HPC. Parmi ces marqueurs, des marqueurs spécifiques des cellules épithéliales biliaires comme CK-7, CK19, Sox9, HNF1 $\beta$  et OV-6, des marqueurs hépatocytaires tel que CK18 et CK8 ainsi que des marqueurs de types hépatoblastes fœtaux tels que l'AFP et un ou plusieurs marqueurs de cellules souches, tels que ckit / CD117, CD34, Sca-1, et Thy1 / CD90 (Miyajima et al., 2014) et des marqueurs hématopoïétiques CD45 et CD109 (Li et al., 2014). Ces cellules expriment également la molécule d'adhésion des cellules neurales (NCAM), la prominine 1 (CD133)(Suzuki et al., 2008) (Rountree et al., 2007), la télomérase et la molécule d'adhésion des cellules épithéliales (EPCAM) (Okabe et al., 2009). Cependant, ces marqueurs ne permettent pas d'identifier d'une façon spécifique cette population de HPC.

Diverses études ont mis aux points diverses stratégies pour isoler les HPCs pour essayer de mieux caractériser ces cellules et de mettre en évidence un potentiel marqueur spécifique et unique. La technique la plus couramment utilisée reste le tri cellulaire par cytométrie en flux par le biais de marqueurs de surface cellulaire comme EpCAM, CD133 soit dans certain modèle de souris transgénique par le biais de rapporteurs fluorescents à une protéine exprimée par le HPC comme Sox9. Les cellules, ainsi isolée à partir de foie de souris majoritairement mais également à partir de foie humain, étaient caractéristiques de ce qui a été décrit dans la littérature. Sur le plan morphologique ces cellules ont une forme ovale, elles ont également une capacité à se diviser en culture et se différencie en hépatocyte et en cholangiocyte dans

certaines conditions de culture et *in vivo* dans certaine étude de repeuplement du foie d'un hôte (Kamiya et al., 2009) (Li et al., 2014) (Tableau 1). Ce qui est important à noter est que les cholangiocytes isolés d'un foie normal avec les mêmes marqueurs, présentent également le même potentiel de former des colonies *in vitro*. Ceci pourrait donc être un biais dans la caractérisation de manière spécifique d'un HPC provenant d'un foie malade.

**Tableau 1 :** Identification et caractérisation des cellules souches / progénitrices du foie chez l'adulte par tri cellulaire (Miyajima et al., 2014)

Species	Markers and/or the Mouse Lineage Tracing Model Used	Liver Sample/Disease Model Used	Clonogenicity	Bipotency in Clonogenic Analysis	Repopulating Activity In Vivo	References
Mouse	CD133 <sup>+</sup> /CD45 <sup>-</sup>	normal	+	+	NT	(Rountree et al., 2007)
		ANIT	+	+	NT	(Rountree et al., 2007)
		CCl <sub>4</sub> (chronic)	+	+	NT	(Rountree et al., 2007)
		DDC	+	+	NT	(Rountree et al., 2007)
	CD133 <sup>+</sup> /D45 <sup>-</sup> / TER119 <sup>-</sup>	normal	± (small colonies only)	cholangiocytic	NT	(Suzuki et al., 2008)
		DDC	+ (both large and small colonies)	+	+ (Fah <sup>-/-</sup> mice)	(Suzuki et al., 2008)
	CD45 <sup>-</sup> /TER119 <sup>-</sup> /c-Kit <sup>-</sup> / Sca1 <sup>-</sup> /CD13 <sup>+</sup> /CD49 <sup>+</sup> / CD133 <sup>+</sup>	normal	+	+	+ (nude mice, Rs + PHx)	(Kamiya et al., 2009)
		Epcam <sup>+</sup>	normal	+	+	NT
	CD24 <sup>+</sup> /CD45 <sup>-</sup> /TER119 <sup>-</sup>	DDC	+	+	NT	(Okabe et al., 2009)
		normal	NT	NT	+ (Fah <sup>-/-</sup> mice)	(Qiu et al., 2011)
	MIC1-1C3 <sup>+</sup> /CD133 <sup>+</sup> / CD26 <sup>-</sup> /CD45 <sup>-</sup> /CD11b <sup>-</sup> / CD31 <sup>-</sup>	normal	+	+	± (Fah <sup>-/-</sup> mice) *1	(Dorrell et al., 2011)
		DDC	+	+	± (Fah <sup>-/-</sup> mice) *1	(Dorrell et al., 2011)
	Sox9-CreERT2 BAC Tg (R26R-YFP reporter <sup>+</sup> ) / CD45 <sup>-</sup> /CD11b <sup>-</sup> /CD31 <sup>-</sup>	DDC	+	NT	NT	(Dorrell et al., 2011)
	Foxl1-Cre Tg (R26R-YFP reporter <sup>+</sup> ) / CD45 <sup>-</sup>	DDC	+	+	NT	(Shin et al., 2011)
Lgr5-LacZ Ki (LacZ <sup>+</sup> )	CCl <sub>4</sub> (acute)	+ (organoids)	+	+ (FRG mice)	(Huch et al., 2013)	
Rat	EpCAM <sup>+</sup>	D-gal	NT	NT	+ (Rs + PHx)	(Yovchev et al., 2008)
Human	EpCAM <sup>+</sup>	neonates (0–1 year); pediatric (2–13 years); adult (19–81 years)	+	+	+ (NOD/SCID mice)	(Schmelzer et al., 2007)
		ALDH <sup>+</sup> (enzyme activity)	(unknown)	+	hepatocytic	NT

NT, not tested. ANIT,  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate; DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidine; D-gal, D-galactosamine. Rs + PHx, retrorsine + partial hepatectomy; FRG, Fah<sup>-/-</sup> Rag2<sup>-/-</sup> Il2rg<sup>-/-</sup>. \*1 < 0.1% of the total liver in 2 out of 20 Fah<sup>-/-</sup> mice (Huch et al., 2013).

Les recherches actuelles sur le HPC se focalisent sur la détection d'un marqueur universel spécifique de l'HPC et permettant de le distinguer d'un cholangiocyte. Parmi ces études, Trop2 une molécule transmembranaire qui ressemble au niveau structurel à EpCAM, s'est

révélée être exprimée d'une façon spécifique à l'HPC dans des conditions de lésion hépatique induite par le 3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) mais pas au niveau cholangiocytaires d'un foie normal (Okabe et al., 2009). Cependant, le potentiel prolifératif et de différenciation de ces cellules n'a pas encore été prouvé. Une étude particulièrement intéressante a mis en évidence l'expression du marqueur Lgr5, un marqueur bien connu pour marquer les cellules souches de l'intestin, d'une façon spécifique au HPC dans des modèles de lésions hépatiques induites par le DDC. Les cellules isolées ainsi (Lgr5+) étaient capables de former des organoïdes (Huch et al., 2013). Cependant, le problème de ces cellules, est que l'expression de Lgr5 est induite par les lésions hépatiques qu'on ne retrouve pas au niveau des foies normaux et donc on ne peut pas l'utiliser pour identifier l'HPC dans des conditions physiologiques saines.

Au final, des recherches supplémentaires sont censées être réalisées pour mieux étiqueter d'une façon spécifique l'HPC et prouver une fois pour toutes son implication dans la physiologie hépatique.

#### 4-4-2- Etude de traçage des HPC :

Dans le but de déterminer le rôle physiologique de ces progéniteurs hépatiques, notamment au niveau de la régénération du foie, plusieurs études employant des techniques de traçage des HPC ont été réalisées. Deux grandes écoles ont émergé quant à l'identité et les fonctions de l'HPC.

La première école, persuadée de l'existence de l'HPC comme une cellule à part entière faisant partie de la composition cellulaire hépatique avec une vraie identité spécifique non découverte jusqu'à aujourd'hui. Ces HPC ont un rôle indispensable dans le processus de régénération hépatique qui survient suite à la défaillance ou l'insuffisance du premier processus régénératif impliquant les hépatocytes.

La deuxième école, beaucoup moins persuadée de l'existence de l'HPC avec des hypothèses différentes sur l'identité de ces cellules bipotentes et de leurs provenances au cours d'une atteinte hépatique. Selon cette école, Les HPC seraient des hépatocytes différenciés nommés notamment hépatoblastes en référence à l'hépatocytes fœtal, ou dans la majorité des publications sous le terme d'hépatocytes intermédiaires. Ces hépatocytes intermédiaires participeraient d'une façon très minoritaire à la régénération hépatique.

- *Première école : l'HPC participe à la régénération hépatique :*

Depuis la première citation bibliographique du terme « oval cell » faisant allusion au fameux HPC en 1961 et jusqu'à nos jours, plusieurs études ont été réalisées pour démontrer l'implication des HPC dans la régénération hépatique.

Plusieurs études de traçabilité ont été réalisées pour identifier le rôle des HPCs dans la régénération. Ces études ont été réalisées grâce à des systèmes de recombinaison de type Cre/LoxP pour induire une altération spécifique au niveau de l'ADN.

Parmi ces études, le traçage d'HPC dans un modèle de souris Sox9creER(T2)-R26R(YFP) a révélé la participation des HPC dans la repopulation du parenchyme hépatique d'une façon modeste dans un modèle de lésion hépatique avec du DDC (3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine ou diéthyl-1,4-dihydro-2,4,6-triméthyl) (Dorrell et al., 2011). L'utilisation d'un modèle Lgr5-ires-CreERT2 par l'équipe de Huch et ces collègues a mis en évidence la participation des HPC Lgr5+ dans la formation des cellules biliaires et des hépatocytes au cours d'une atteinte hépatique induite par le CCl4 (Huch et al., 2013). Une autre étude utilisant le traçage d'HPC dans un modèle de souris OPN-iCreERT2 a démontré une participation de l'HPC d'une façon très faible (0.78% à 2.45%) à la repopulation du foie après une atteinte hépatique induite par un régime carencé en choline et complété avec de l'éthionine ou un régime au DDC (Español-Suñer et al., 2012). Une étude réalisée par

Furuyama et ses collègues ont démontré dans un modèle de souris Sox9CreERT2, une expansion des cellules positives pour Sox9 dans l'ensemble du parenchyme hépatique au cours de la régénération du foie, ce qui démontre que les cellules HPCs positives pour Sox9 sont une source d'hépatocytes au cours de la régénération hépatique induite par le CCl4 (Furuyama et al., 2011).

Cependant, ce qui est important à noter, est que toutes les études de traçabilité et de marquage sont réalisées à partir de marqueurs exprimés également au niveau cholangiocytaire, ce qui biaisait en quelque sorte l'origine des observations obtenues.

Toutes ces études intéressantes sont critiquables. En effet même si les modèles chroniques ou de chirurgies utilisées permettaient d'induire une régénération, la capacité proliférative de l'hépatocytes, est majoritaire et rend quasi impossible de déterminer la contribution réelle de l'HPC au cours de l'atteinte hépatique. Donc, aucun modèle présenté par ces études n'a permis de reproduire d'une façon pertinente la sénescence hépatocytaire présente au cours d'une atteinte hépatique avancée.

D'autres équipes ont utilisé des modèles impliquant la sénescence hépatocytaire. Un modèle de rat traité par de l'acétylaminofluorène (AAF), une substance cancérigène induisant la sénescence hépatocytaire, a démontré que la capacité proliférative de l'hépatocyte était diminuée de plus de 50% permettant l'observation d'une véritable expansion d'HPC dans le foie (Sarraf et al., 1994) (Golding et al., 1995) (Katoonizadeh et al., 2006).

Une étude réalisée sur le poisson zèbre avec induction de la sénescence hépatocytaire par traitement au métronidazole a révélé la capacité de différenciation des cellules biliaires en hépatocytes (Choi et al., 2014).

L'équipe de Lu et al a mis au point un modèle de souris où l'apoptose des hépatocytes est généralisée, la nécrose et la sénescence peuvent être induites par une surexpression de p53 par

l'intermédiaire d'une suppression conditionnelle hépatocytaire de l'inhibiteur de p53 le Mdm2 (Lu et al., 2015). Cela a abouti à l'activation massive et rapide des HPC, suivie d'une reconstitution complète du foie par des hépatocytes fonctionnelles p53-négatifs. Cette étude suggère la contribution fonctionnelle des HPC dans le processus de régénération en produisant des hépatocytes sains.

Compte tenu de toutes ces preuves, il semble que le HPC ait un rôle à jouer dans la régénération des maladies du foie chez l'homme.

Cependant, de nos jours, les publications ont démontré l'existence de trois niches d'HPC. La première niche la plus explorée est celle des HPC présents dans le canal de Hering. Une seconde niche selon laquelle les hépatocytes adjacents à la veine centrolobulaire, désignées comme hépatocytes péricentraux, sont capables de donner des hépatocytes vers les zones périportales au cours d'un renouvellement spontané suite à des lésions légères (Wang et al., 2015a). Une troisième niche d'HPC désignée comme hépatocytes périportaux Sox9+, capable de proliférer et de reconstituer la masse hépatique suite à des lésions chroniques (Font-Burgada et al., 2015).

On peut en conclure que la restauration du foie résulte de la régénération des hépatocytes et des HPC et que la contribution de chaque compartiment dépend du contexte physiopathologique sous-jacent.

- *Deuxième école : l'HPC ne contribue pas à la régénération hépatique :*

Contrairement aux évidences fournies par la première école sur la participation de l'HPC à la régénération hépatique, la deuxième école a mis au point des études de traçabilité sur différents modèles d'atteinte hépatique pour démontrer que les nouveaux hépatocytes et même les cholangiocytes proviennent d'hépatocytes préexistants et non pas des HPC.

L'étude réalisée par Rodrigo-Toress et al, a permis de démontrer une participation minime voir inexistence des HPC au niveau hépatique (Rodrigo-Torres et al., 2014). Leur étude de traçabilité sur un modèle de souris  $Hnf1\beta^{CreER/R26R^{Yfp/LacZ}}$  pour marquer les cellules HPC  $Hnf1\beta^+$  et leur rôle dans la régénération des hépatocytes a montré que dans un état physiologique normal ou suite à une perte hépatique ou une atteinte aigue induite par l'acétaminophène ou le tétrachlorure de carbone aucune contribution des cellules HNF1 $\beta$  (+) n'a été détectée. Cette équipe a également montré dans des modèles d'atteintes hépatiques induisant une expansion d'HPC comme le DDC et le CDE, une participation uniquement des cellules  $Hnf1\beta$  (+) dans la régénération hépatocytaire dans le modèle CDE et non pas dans le modèle DDC. Cependant, la contribution des cellules  $Hnf1\beta$  (+) dans la repopulation hépatocytaire ne représentait que 1.86% du nombre total d'hépatocytes après la repopulation et la guérison du foie (Rodrigo-Torres et al., 2014).

Une autre étude publiée a également montré, en utilisant plusieurs techniques de traçage cellulaire que les nouveaux hépatocytes ne provenaient pas des HPC, des cholangiocyte ou des cellules hépatiques mésenchymateuses dans un modèle de souris traitées au CDE. Ces hépatocytes ainsi obtenues provenaient uniquement d'hépatocytes préexistantes (Schaub et al., 2014).

Le traçage des cellules biliaires, des hépatocytes et des cellules en division par Yanger et al confirme que les nouveaux hépatocytes et les cholangiocytes proviennent d'hépatocytes préexistantes dans des modèles d'hépatectomie et de lésions hépatiques induites par du CDE ou du DDC (Yanger et al., 2014). Ces mêmes résultats ont été obtenus dans une autre étude réalisée par Tarlow et al en réalisant le traçage et le devenir des cellules Sox9+ (Tarlow et al., 2014)

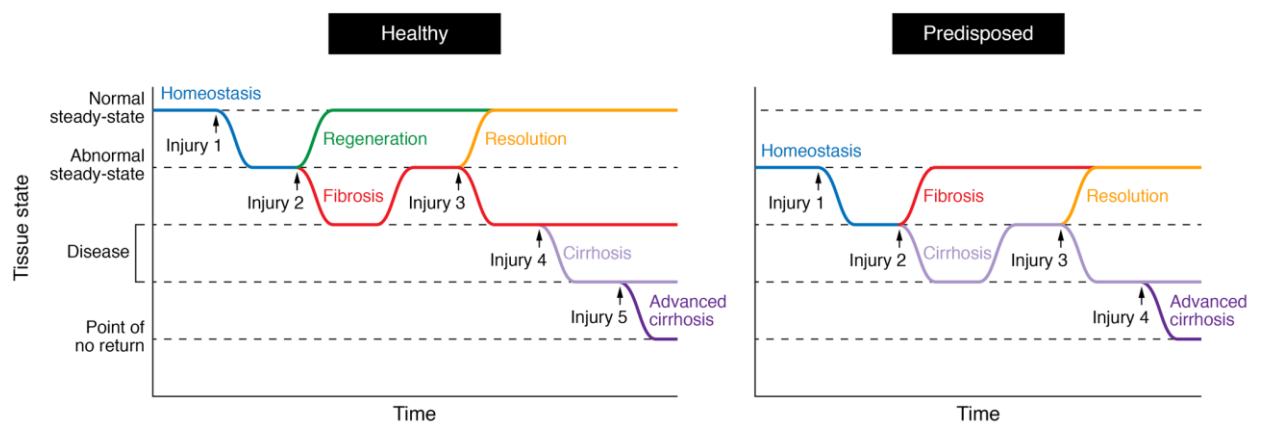


Au final, une étude intéressante est même venue affirmer que les hépatocytes, et non les cholangiocytes sont la principale source de cellules de types ductules primitifs formés en réponse à des lésions hépatiques chroniques (Sekiya and Suzuki, 2014).

Le point faible majeur de ces travaux est qu'aucun d'entre eux n'a pris en considération le processus de régénération hépatocytaire. Dans toutes ces études, la régénération hépatocytaire était activée, et par suite, conduit à la réflexion sur la pertinence des discussions obtenues sur la réelle participation de l'HPC dans la régénération hépatique dans un contexte de sénescence hépatocytaire.

#### 4-5- Inflammation, fibrose et régénération : un dialogue complexe

La régénération hépatique ainsi que la fibrose partagent une cascade d'événements provoqués par une lésion chronique au cours de l'atteinte hépatique (Figure 8).



**Figure 9 :** La périodicité des dommages altère la capacité du tissu à revenir à l'homéostasie

Chez les individus en bonne santé, une lésion tissulaire ponctuelle (lésion 1) du foie suscite une réponse régénératrice (courbe verte) pour rétablir l'homéostasie ou l'état d'équilibre. Les blessures répétées (blessures 1 + 2) entravent la régénération et font dériver le système dans un état malade appelé fibrose (courbe rouge). Le tissu peut en récupérer à mesure que le temps avance si aucun dommage supplémentaire n'est appliqué (résolution, blessures 1 + 2 +, courbe jaune). Sinon, la fibrose sera maintenue face aux nouveaux dommages (blessures 1 + 2 + 3, courbe rouge). Des lésions supplémentaires détériorent le tissu jusqu'à ce qu'il atteigne un état cirrhotique (1 + 2 + 3 + 4, courbe violet clair) ou un état cirrhotique avancé (1 + 2 + 3 + 4 + 5, courbe violet foncé). La récupération de ce dernier scénario est très improbable. (À droite) Le tissu d'individus prédisposés (par exemple âgés) fonctionne à un état stable anormal qui les rend susceptibles de développer une fibrose, accélérant ainsi la progression de la maladie et atteignant un point de non récupération plus tôt (Cordero-Espinoza and Huch, 2018).

L'interaction mise en place entre les différents types cellulaires notamment les cellules épithéliales, les cellules du système immunitaires, les cellules endothéliales et mésenchymateuses sont les principaux acteurs au cours de cette cascade d'évènements (Figure 9).

Le système immunitaire présent au cours de l'atteinte cellulaire va conduire à une inflammation qui va survenir avant le processus de régénération et sera dépendante du contexte pathologique et de l'étiologie sous-jacente (Gurtner et al., 2008).

Au cours d'une atteinte cellulaire ou tissulaire, les cellules en souffrance ou les antigènes du non soi, sont généralement détectés par le système immunitaire inné ou via les leucocytes résidents qui vont produire des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires comme les TNF- $\alpha$  pour exacerber la réponse immunitaire aux lieux endommagés (Canbay et al., 2003).

Dans le contexte de la maladie alcoolique du foie ou de la stéatohépatite non alcoolique, la prolifération de bactéries intestinales, dont l'un de leur composant est le LPS, et leurs translocations de l'intestin au foie provoquent l'activation et l'induction des macrophages résidents nommées cellules de Kuppfer et provoquent par la suite la production des espèces réactives de l'oxygène et du TNF- $\alpha$  (Hines and Wheeler, 2004) (Tilg and Moschen, 2010).

Les cellules mésenchymateuses présentes au cours de l'atteinte permettent de renforcer la réponse inflammatoire (Viñas et al., 2003). Ces cellules mésenchymateuses participent à la réponse immunitaire innée via les processus classiques comme la phagocytose, l'activation des lymphocytes T après présentation antigénique ou par la régulation d'expression de chimiokines qui vont induire le recrutement leucocytaire (Marra et al., 1993) (Holt et al., 2009) et l'expression des molécules d'adhésion (Knittel et al., 1999).

L'acétaldéhyde, le principal produit métabolique de l'alcool, stimule directement le profil pro-inflammatoire et fibrogène des cellules étoilées « HSC » (Maher et al., 1994) . Des études

réalisées sur des morceaux de peaux lésées après stimulation *in vitro* avec du LPS et du TNF- $\alpha$  ont démontré que les péricytes induisent l'expression d'ICAM-1 et la sécrétion des facteurs inhibiteurs de la migration des macrophages pour conduire à un recrutement des macrophages et des neutrophiles (Stark et al., 2013). Dans un contexte de maladie alcoolique du foie, les macrophages peuvent à leur tour activer les HSC quiescentes qui s'activent et se transforment en myofibroblastes et commencent à sécréter des facteurs profibrosants tels que le TGF- $\beta$ , PDGF et le TNF- $\alpha$  (Kamimura and Tsukamoto, 1995) (Matsuoka and Tsukamoto, 1990) (Friedman and Arthur, 1989).

La déplétion des macrophages dans des modèles transgéniques ou par des produits chimiques comme le chlorure de gadolinium ou le clodronate liposomal (Ide et al., 2005) (Sunami et al., 2012) (Pradere et al., 2013) réduit d'une manière très importante l'activation fibroblastique et la fibrose tissulaire au cours d'une atteinte chronique. Cependant, les populations de macrophages sont hétérogènes et toutes ne contribuent pas de manière égale à la fibrose (Tacke and Zimmermann, 2014). Les cellules de Kupffer, assurent l'immunosurveillance des tissus et participent également à la réponse immunitaire par le biais de la sécrétion du TNF et de l'IL6 (Selzner et al., 2003) (Meijer et al., 2000). Cependant, Au cours de la progression du contexte inflammatoire, le nombre de ces cellules diminue en faveur d'une augmentation du recrutement des macrophages dérivant des monocytes à partir du sang (Marra et al., 1999) (Dambach et al., 2002). Cette dernière population, décrite comme CD11B<sup>hi</sup>F4 / 80<sup>int</sup>Ly6C<sup>hi</sup>, sécrète des taux élevés de TGF- $\beta$  et de thrombospondine 1 supportant ainsi le contexte fibrotiques (Karlmark et al., 2009) (Ramachandran et al., 2012).

Bien que profibrotiques, les macrophages jouent un rôle très complexe dans le processus de régénération (Duffield et al., 2005) (Fallowfield et al., 2007). L'utilisation de modèles transgéniques, présentant une altération d'infiltration des macrophages dérivant des monocytes, démontre une diminution de la fibrose hépatique mais également de leurs

capacités à régénérer (Mitchell et al., 2009) (Taimr et al., 2003). Dans un contexte de régénération avancée, les macrophages dérivant des monocytes subissent un changement phénotypique profibrotique en phénotypes régénératifs caractérisés par une augmentation de l'expression de certaines métalloprotéinase (MMP9, MMP12 et MMP13) pour éliminer l'excès de la matrice extracellulaire (ECM) mais également une augmentation de l'expression de TNF10 et TRAIL. Dans ce contexte, l'expression élevée de TNF10 et TRAIL a pour effet de déclencher l'apoptose des myofibroblastes activés en raison de la présence à leurs surfaces des récepteurs TRAIL1 et 2 (Taimr et al., 2003).

En ce qui concerne les lymphocytes T, les cellules Th2 sécrètent de l'IL-4 et de l'IL13 qui va stimuler l'expression du TGF- $\beta$  par les macrophages, ce dernier va induire l'activation des HSC en myofibroblastes et par suite aggraver la fibrose (Doucet et al., 1998) (Chiaromonte et al., 1999). Les cellules Th1, quant à eux, produisent de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-12, qui neutralisent la production de TGF- $\beta$  (Wynn et al., 1995) (Marth et al., 1997) et par suite un impact sur la progression de la fibrose.

Les cellules endothéliales (LSEC) ont également un rôle important dans la régulation de l'homéostasie hépatique au cours d'une atteinte pathologique et également dans l'angiogenèse observé au cours de la fibrose (Ehling et al., 2014). Les LSEC, représentent un conduit pour les composants pro-inflammatoires systémiques et sécrètent également des facteurs importants pour la régénération des cellules épithéliales (Ding et al., 2010). Des études récentes ont permis de mettre en évidence les mécanismes physiologiques par lesquels les LSEC étaient capables de réguler l'équilibre de la régénération et de la fibrose (Ding et al., 2010) (Ding et al., 2014). Cette étude a montré que dans un contexte d'atteinte aiguë, les LSEC surexpriment le récepteur de la chimiokine CXCR7, qui va interagir avec les signaux émis par CXCR4 pour induire la production des facteurs de régénération tels que WNT2 et l'HGF pour stimuler la prolifération hépatocytaire (Ding et al., 2010) (Ding et al., 2014).

Dans un contexte d'atteinte hépatique plutôt chronique, la signalisation du FGFR1 produit une diminution de l'expression du ratio de CXCR7 à CXCR4 et provoque ainsi l'expression de cytokine profibrotique et l'activation des HSC.

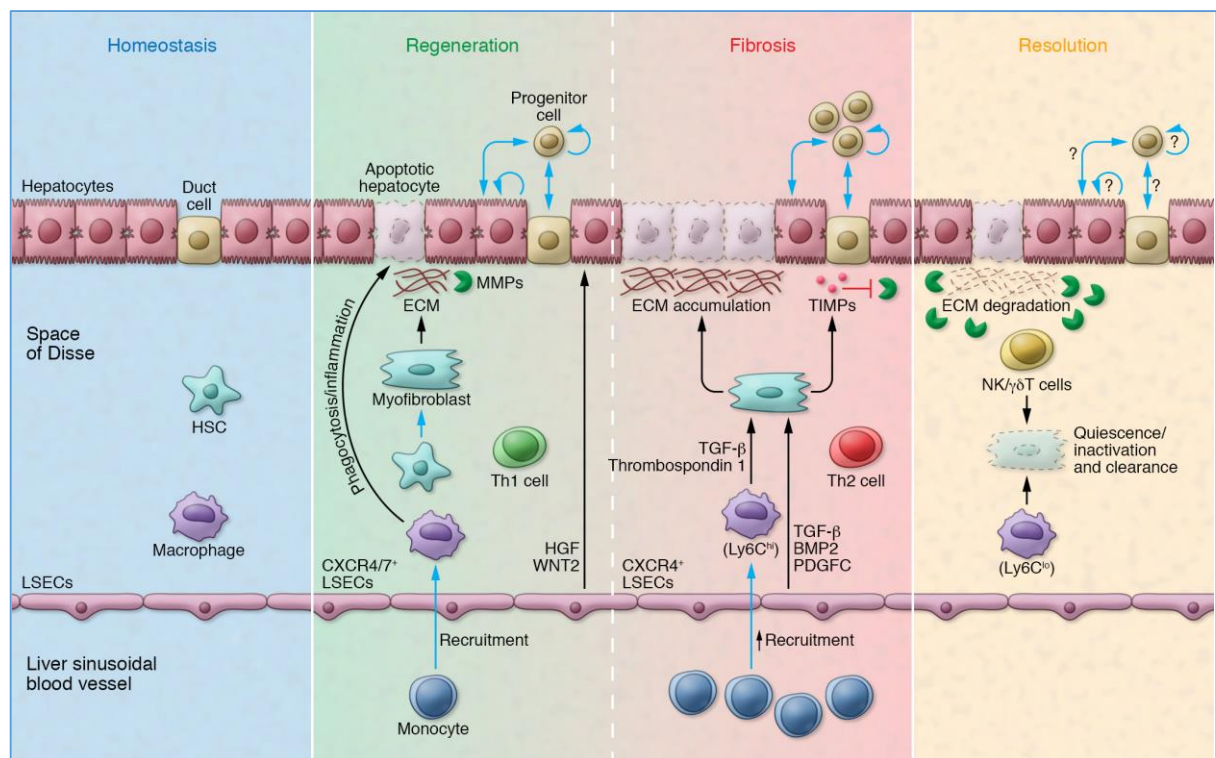
Le processus de régénération hépatique est caractérisé par une cinétique contrôlée de l'expression de certains gènes, et une altération de cette dynamique d'expression est capable d'impacter le retour à l'homéostasie. Cette dynamique est retrouvée dans les LSEC qui régulent l'expression de l'angiopoétine2 (ANG2) en la réduisant après une atteinte hépatique aiguë pour diminuer l'expression du TGF- $\beta$  et favoriser, par la suite, la prolifération hépatocytaires. Une fois la régénération parenchymateuse terminée, le taux d'expression d'ANG2 est augmenté et induit une surexpression de VEGFR2 dans les LSEC pour favoriser leurs propres expansions (Hu et al., 2014).

La dynamique d'expression des gènes est également retrouvée dans les HSC en régulant le taux d'expression de BMP9, un membre de la famille du TGF- $\beta$ , des taux élevés de cette protéines est en faveur de l'expansion des HSC et par suite la survenue de la fibrose tandis que des taux plus faibles sont en faveur de la régénération parenchymateuse et l'expansion des hépatocytes (Breitkopf-Heinlein et al., 2017).

La régénération hépatique est basée en grande partie sur une restauration parenchymateuse basée sur la prolifération hépatocytaire mais également l'expansion et la différenciation des HPC. Cependant, pour arriver à restaurer le parenchyme hépatique, les cellules stromales (myofibroblastes, macrophage et LSCE) sont les chefs d'orchestre du devenir des cellules épithéliales du parenchyme hépatique via un dialogue étroit et décisif de la régénération.

Les cellules stromales régulent également les voies de signalisation Wnt et Notch qui sont importantes pour la régulation de la prolifération des cellules souches et leurs différenciations.

Une étude réalisée par Luke Boulter et son équipe a démontré l'implication de ces deux voies de signalisation dans l'orientation de la différenciation des progéniteurs hépatiques en hépatocyte ou en cholangiocyte durant la régénération hépatique. Cette étude originale réalisée sur des modèles de souris traitées avec un régime contenant du 3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) ou déficient en choline et supplémenté en éthionine (CDE) et des échantillons de foie humain, a démontré que les cellules de kuppfer étaient à l'origine de la sécrétion des ligands Wnt (notamment le ligand Wnt3a) à la base de la différenciation des HPC en hépatocyte par l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et que les fibroblastes par l'intermédiaire de leurs ligands JAG et DLL induisent la différenciation des HPC en cholangiocyte via l'activation de la voie Notch (Boulter et al., 2012) (Strazzabosco and Fabris, 2013).



**Figure 10** : illustration représentative des différents processus cellulaires impliqués dans l'homéostasie, la régénération, la fibrose et la cicatrisation hépatique (Cordero-Espinoza and Huch, 2018).

En outre, la sévérité de la fibrose hépatique dans de nombreuses pathologies humaines, y compris la maladie alcoolique du foie, est étroitement liée à l'expansion des HPC dans le parenchyme hépatique (Roskams et al., 2003) (Dubuquoy et al., 2015a).

Même si le remodelage de l'ECM survient avant la survenue de la réaction ductulaire (Van Hul et al., 2009), des données de la littérature démontrent une influence directe de sa composition sur le devenir des HPC. Les résultats obtenus par Lorenzini et al, démontrent que la laminine et la fibronectine, des composantes de la matrice extracellulaire semblent capables d'orienter la différenciation des HPC. La culture des HPC, isolés à partir de souris, sur une matrice composée de laminine, a favorisé la différenciation de ces dernières en cholangiocytes tandis que la culture sur une matrice de fibronectine, a favorisé plutôt la différenciation hépatocytaire (Lorenzini et al., 2010).

La formation d'une réaction ductulaire et d'une prolifération accrue des HPC dans le parenchyme hépatique induit une augmentation de l'expression de cytokines fibrotiques tels que le PDGF, le TGF- $\beta$ , l'IGF ainsi que des chimioattractants de monocyte comme le MCP-1, et par suite l'aggravation de la pathogenèse préexistante (Grappone et al., 1999) (Luo et al., 2005) (Kruglov et al., 2006). L'expression de la lymphotoxine- $\beta$  par les cellules ductulaires participe également à l'aggravation de la fibrose par le biais de l'augmentation de l'expression de molécules de recrutement leucocytaires tels qu'ICAM-1 et CCL5 à leurs surfaces (Ruddell et al., 2009).

#### *4-6- Le processus de régénération hépatique est défectueux dans l'HA :*

Basée sur des données cliniques et biologiques, l'HA a été décrit comme un trouble inflammatoire aiguë associé à une apoptose importante du parenchyme hépatique.

Une première étude publiée par notre équipe a démontré que la pathogenèse de l'HA est un équilibre complexe entre l'inflammation du foie, la mort cellulaire, la réparation tissulaire

et la régénération du foie (Dubuquoy et al., 2015a). Cet équilibre est rompu chez les patients ne répondant pas au traitement médical (corticothérapie) avec une profonde altération de la régénération du foie et plus particulièrement du compartiment hépatocytaire ainsi qu'une réponse inadaptée des progéniteurs hépatiques.

L'IL-8, chimioattractant du neutrophile, était fortement induite dans l'HA. Une forte diminution de l'expression d'albumine et du marquage HepPar1 confirmait un important déficit en hépatocytes fonctionnels dans l'HA. Le TNF et l'IL-6, cytokines essentielles à la régénération, étaient diminuées dans l'HA par rapport au foie normal. Cette diminution était associée à un profil complexe d'activation de la voie NF-kB suggérant une tolérance vis à vis du LPS. Le Ki-67 montrait une quasi absence de prolifération des hépatocytes dans l'HA et le foie contrôle à l'inverse de la cirrhose. Ce déficit de prolifération des hépatocytes était associé à une profonde altération des mitochondries dont les enzymes de réparation de l'ADN (OGG1, Neil1) étaient très fortement sous-exprimées.

La prolifération des progéniteurs hépatiques, évaluée par l'expression protéique du facteur de croissance TWEAK et de son récepteur Fn14, était très élevée dans l'HA, à un moindre degré dans la cirrhose et très faible dans le foie contrôle. Dans le lobule hépatique, la présence de progéniteurs, marqués pour la cytokératine CK7, n'était observée que dans l'HA ; alors qu'au cours de la cirrhose les progéniteurs étaient présents uniquement dans les bandes de fibrose. Dans l'HA, le phénotype des progéniteurs était uniquement biliaire comme objectivé par le marquage de la CK19.

Cette étude a également démontré une dérégulation très importante de la composition de la matrice extracellulaire (ECM). Les patients atteints d'hépatite alcoolique avaient une matrice riche en laminine avec une perte de l'expression fibronectine. La composition de l'ECM était capable également d'influencer la différenciation des HPC, la culture d'HepaRG



(cellules bipotentes utilisées pour étudier les HPC) avait tendance à se différencier plus en cholangiocytes sur matrice riche en laminine et en hépatocytes sur matrice riche en fibronectine. Ces observations étaient également retrouvées sur les HPC murin mis en culture sur ces deux matrices (Lorenzini et al., 2010) .

Ces données suggéraient à l'époque une différenciation altérée de ces progéniteurs qui sont incapables de donner naissance à suffisamment d'hépatocytes fonctionnels (Dubuquoy et al., 2015a).

## 5- La voie de signalisation Hippo/YAP

### 5-1- Composition de la voie de signalisation Hippo/YAP

La voie Hippo/YAP a été identifiée pour la première fois chez la *Drosophila melanogaster* au moyen de criblages génétiques destinés à identifier les facteurs régulateurs clés de la croissance tissulaire entraînant la prolifération excessive des organes en raison d'une prolifération cellulaire accrue et d'une résistance aux signaux pro-apoptotiques (Justice et al., 1995) (Xu et al., 1995) (Dong et al., 2007a).

Le premier composant de la voie de signalisation Hippo identifié par ces moyens était la kinase Warts également connue sous le nom de Lats, qui, une fois supprimée, provoquait une hyperprolifération cellulaire et une prolifération épithéliale (Justice et al., 1995) (Xu et al., 1995). Des études complémentaires ont identifié Sterile 20-like (STE20) kinase Hippo (Hpo) et la scaffolding proteins Salvador (Sav) et Mob (Mats) comme gènes suppresseurs de tumeur. Leur inhibition induit une prolifération cellulaire accrue et une diminution de l'apoptose (Tapon et al., 2002) (Harvey et al., 2003) (Pantalacci et al., 2003) (Lai et al., 2005). Des études biochimiques ont ensuite permis d'identifier ces quatre protéines comme étant les kinases principales de la cascade de signalisation de la voie Hippo (Wu et al., 2003) (Huang et al., 2005). L'activation de la voie est représentée par la formation du complexe Sav et Mats qui vont induire la propagation du signal via une cascade de phosphorylation conduisant à l'activation et à la phosphorylation de Wts par Hpo (Pan, 2010) (Varelas and Wrana, 2012). Une étude de criblage des protéines en interaction avec Wts sur des hybrides de levure ont permis d'identifier l'effecteur transcriptionnel Yorkie (Yki) comme étant l'effecteur clé de la voie de signalisation Hippo (Huang et al., 2005). Les mutations de Yki, ayant pour but un gain de fonction, ont conduit à un phénotype de prolifération cellulaire similaire aux

mutations de perte de fonction observées dans les membres de la cascade de signalisation Hippo (Huang et al., 2005).

L'activation des kinases wts conduit directement à la phosphorylation de Yki pour inhiber sa translocation dans le noyau par séquestration et rétention au niveau du cytoplasme par les protéines 14-3-3 (Dong et al., 2007a) (Oh and Irvine, 2008). La phosphorylation de Yki induit son activation et sa translocation dans le noyau pour se lier à son cofacteur de transcription dans Scalloped (Sd) et induire l'expression de gène favorisant la prolifération cellulaire et la suppression de l'apoptose (Goulev et al., 2008) (Zhang et al., 2008).

La voie de signalisation Hippo est hautement conservée et tous les composants centraux de la voie ont des orthologues directs chez les mammifères.

Comme chez la *Drosophila*, les composants principaux de la cascade de signalisation de la voie hippo chez les mammifères est composée des protéines kinases STEP « MST1 et MST2 » (homologues de Hpo), qui phosphorylent et activent les kinases LATS1 et LATS2 (homologues de Wts) à l'aide de protéines adaptatrices SAV1 (homologues de Sav) et MOBKL1A et MOBKL1B (homologues de Mats) (Dong et al., 2007b) (Ramos and Camargo, 2012). L'activation des Kinases LATS1 et LATS2 induisent la phosphorylation des co-activateurs de transcription Yes-associated protein (YAP) et le co-activateur de transcription au motif de liaison au PDZ (TAZ) qui est l'homologue d'Yki (Figure.10).

La phosphorylation par LATS1/2 de YAP et de TAZ entraîne la rétention cytoplasmique de ses co-activateurs de transcription par liaison à la protéine 14-3-3 et par suite l'inhibition de l'expression de leurs gènes cibles en empêchant leur translocation dans le noyau.

Comme Yki, YAP et TAZ n'ont pas de domaines de liaison à l'ADN et nécessitent une association avec des facteurs de transcription pour exécuter leurs activités translationnelles. De nos jours, bien qu'un certain nombre de facteurs de transcription ait été décrit pour interagir avec YAP et TAZ, les mieux décrits sont ceux de la famille du domaine activateur de

la transcription (TEAD) (homologues de Sd). Soutenant d'avantage le degré élevé de conservation de la cascade de signalisation de la voie Hippo, l'expression des homologues humains dans des modèles KO d'un membre central de la cascade Hippo chez la Drosophila est capable de restituer le phénotype perdu et de revenir à un état physiologique normal (Wu et al., 2003) (Huang et al., 2005) (Lai et al., 2005).

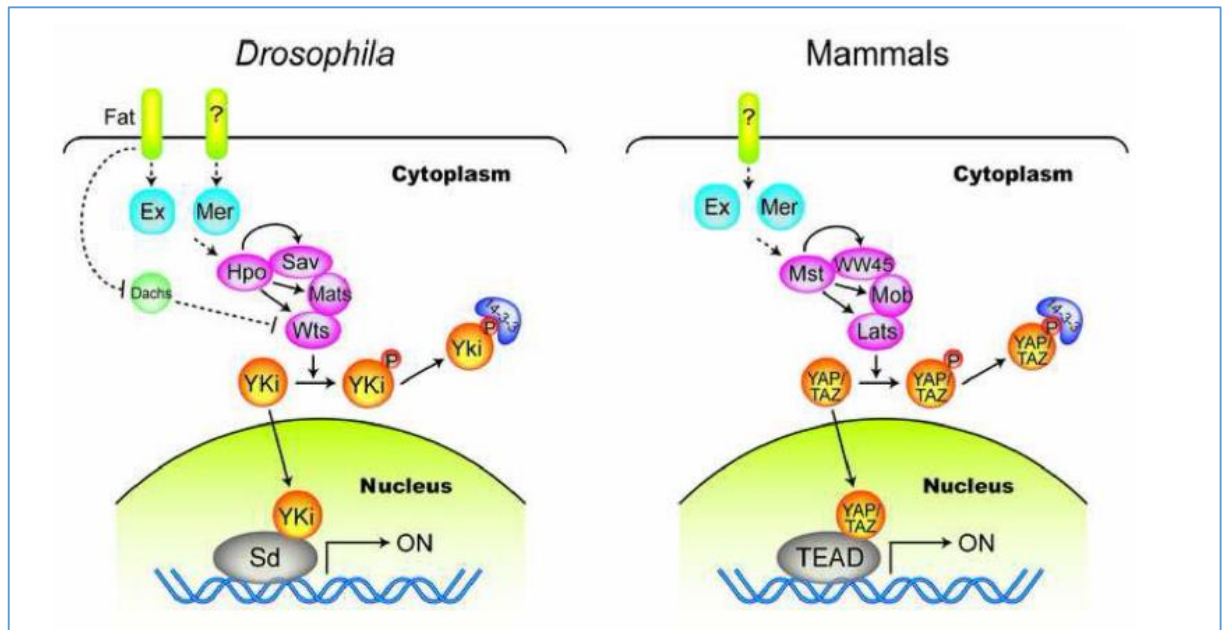


Figure 11 : la voie de signalisation Hippo chez la drosophile et les mammifères

Les composants correspondants chez la drosophile et les mammifères sont présentés dans la même couleur. Les abréviations utilisées sont les suivantes : Ex (Expanded), Mer (Merlin, également appelé NF2), Hpo (Hippo), Sav (Salvador), Mats (Mob comme suppresseur de tumeur), Wts (Verrues), Yki (Yorkie), Sd. (Festonné), Mst (Mst1 / 2, également appelé STK4 et STK3, homologue de Hpo), WW45 (homologue Sav), Mob (analogue à un activateur de kinase Mps One Binder 1A / B, MOBKL1A / B, homologue de Mats), Lats (Lats) / 2, Wts homologue), YAP (protéine associée à Yes, homologue Yki), TAZ (co-activateur de transcription avec motif de liaison à PDZ, également appelé WWTR1, homologue Yki) et TEAD (membre de la famille de domaines TEA 1/2/3 / 4). Les flèches en pointillés indiquent un mécanisme biochimique inconnu et les points d'interrogation désignent des composants inconnus.

### 5-2- YAP :

La cascade de signalisation Hippo sert à réguler l'activité de la protéine co-activatrice de transcription (YAP). YAP a été identifié pour la première fois en tant que partenaire de liaison du proto-oncogène YES par son interaction avec le domaine d'homologie Src (SH3) (Sudol,

1994). Le clonage subséquent du gène a révélé une protéine modulaire avec diverses structures de motifs et a permis d'identifier pour la première fois le domaine WW, un domaine conservé caractérisé par la présence de deux résidus de tryptophane espacés de 20 à 22 acides aminés (Figure 11) (Sudol, 1994) (Sudol et al., 1995).

Des données de la littérature ont démontré que les domaines WW sont essentiels dans la formation des interactions avec d'autres protéines, en particulier celles contenant des motifs PPxY (Sudol and Harvey, 2010) (Sudol et al., 2012) (Piccolo et al., 2014). La protéine YAP contient également un domaine activateur de la transcription et un motif de liaison à la PDZ. Le domaine d'activation de la transcription constitue l'extrémité carboxyle de YAP qui ressemble énormément à celle de la protéine VP16 du virus de l'herpès (Yagi et al., 1999). La fusion du domaine de liaison à l'ADN de GAL4 au domaine d'activation de la transcription de YAP démontre une forte activation de la transcription, d'autant plus que ce domaine est requis pour l'activation transcriptionnelle des facteurs TEAD (Yagi et al., 1999). Sa composition acide suggère qu'il peut également initier la transcription en interagissant directement avec les composants de la machinerie transcriptionnelle (Vassilev et al., 2001).

Autre que le domaine d'activation de la transcription, un motif de liaison à PDZ, se trouve également dans l'extrémité carboxyle de YAP. La présence de ce motif de liaison PDZ, composé des cinq acides aminés terminaux, est très importante à sa translocation nucléaire (Oka and Sudol, 2009).

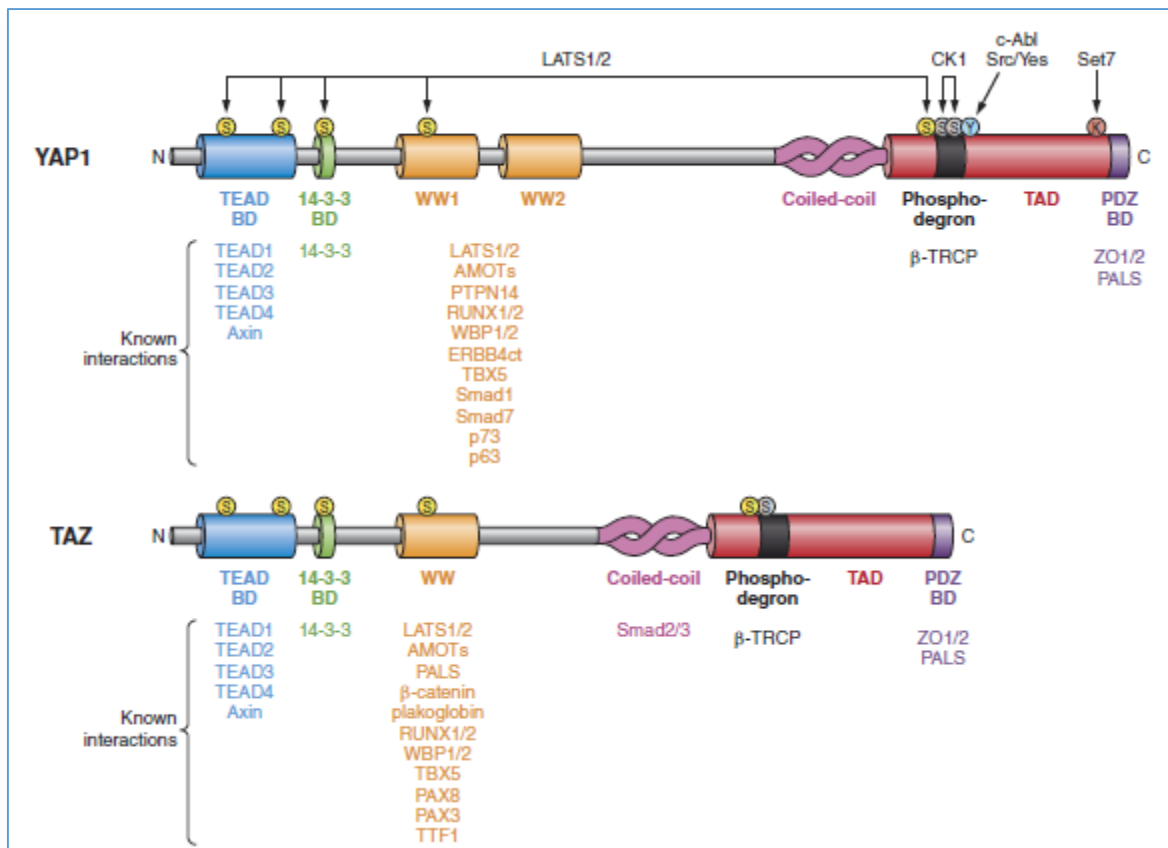


Figure 12 : Représentation schématique illustrant les multiples domaines d'interaction de YAP et TAZ (Piccolo et al., 2014)

Représentation schématique illustrant les multiples domaines de YAP et TAZ, les interactions cartographiées avec d'autres protéines et les résidus ciblés par les modifications post-traductionnelles. Les cinq sérines de YAP et les quatre sérines correspondantes de TAZ ciblées par la phosphorylation de LATS1 / 2 sont indiquées en jaune, les sites de phosphorylation de CK1 sur les deux protéines sont représentés en gris et le site de phosphorylation de c-Abl sur YAP est en cyan. Le résidu de lysine de YAP ciblé pour la méthylation par Set7 est également présent. TEAD BD est le domaine de liaison TEAD. 14-3-3 BD est le domaine qui lie les protéines 14-3-3 lors de la phosphorylation par LATS1 / 2. TAD est le domaine d'activation de la transcription. PDZ BD est le petit domaine COOH-terminal capable d'interagir avec des protéines portant des domaines PDZ (Piccolo et al., 2014).

L'activité de YAP est modulée par un certain nombre de modifications post-traductionnelles, dont beaucoup ont été étudiées et analysées à la fois in vitro et in vivo. L'activation des kinases LATS1/2, qui contiennent des motifs PPxY, interagissent avec la protéine YAP par l'intermédiaire des domaines WW et induisent la phosphorylation d'un certain nombre de résidus sur YAP, y compris la phosphorylation du résidu de la sérine S127 dans YAP humain (S112 dans YAP de souris, S87 dans Yap zébra Fish), qui s'avère être la sérine régulatrice de la localisation YAP.

La phosphorylation de YAP au niveau de sa sérine S127 chez l'homme et de ses résidus respectifs dans ses homologues favorise l'interaction de la YAP avec le 14-3-3 et entraîne sa séquestration cytoplasmique (Basu et al., 2003) (Zhao et al., 2007). LATS1 /2 phosphorylent également les sérines S61, S109, S164 et S381. La phosphorylation de la sérine S381 prépare YAP à la poursuite de la phosphorylation par les kinases CK1 qui va induire le recrutement de l'ubiquitine ligase SCF- $\beta$ TRCP pour une ubiquitination ultérieure et la dégradation de YAP (Zhao et al., 2010).

### 5-3- Régulation de la voie Hippo/YAP :

De nos jours, même si beaucoup de recherches ont permis de décortiquer le corps et les composants de la voie de signalisation Hippo/YAP, elles n'ont pas permis de mettre en évidence le mécanisme universel à la base du contrôle de la voie Hippo. Néanmoins, dans la quête d'identification de ce mécanisme, de nouvelles recherches ont permis d'identifier plusieurs processus de régulation de la voie Hippo.

#### 5-3-1- La régulation Hippo par la méchanotransduction :

La méchanotransduction est un processus physiologique par lequel les cellules perçoivent leur environnement physique, puis réagissent en activant des voies biochimiques.

Les dynamismes du cytosquelette de la cellule et l'activité motrice de la myosine sont deux facteurs essentiels de la méchanotransduction. Elles génèrent une tension isométrique permettant de maintenir la forme et la fonction des cellules en réponse aux forces physiques externes (Mammoto and Ingber, 2009) (Maharam et al., 2015). Des données récentes de la littérature ont démontré que les co-activateurs YAP et TAZ étaient des médiateurs permettant de convertir les signaux mécaniques en sorties de transcription (Dupont, 2016). Le réarrangement du cytosquelette au niveau de la cellule lors de l'exposition à différents stimuli mécaniques, tels que la rigidité de la matrice extracellulaire (ECM) ainsi que les tensions

physiques induites par la confluence cellulaire, étaient capables de modifier la localisation de YAP et de TAZ (Mammoto and Ingber, 2009) (Goldmann, 2014) (Jaalouk and Lammerding, 2009).

La culture des cellules sur des surfaces dites rigides comme sur une matrice 3D composée de matrigel et de collagène 1, était capable d'induire l'inactivation de la voie Hippo et par suite la translocation des YAP et de TAZ au niveau nucléaire. Sur une matrice plutôt molle, YAP et TAZ sont retenues dans le cytoplasme (Aragona et al., 2013) (Dupont, 2016).

La densité cellulaire est également un médiateur qui participe également au processus de méchanotransduction et à la localisation subcellulaire de YAP et de TAZ. Les données de la littérature démontrent qu'une densité élevée de cellules à confluence conduit à la translocation dans le cytoplasme de YAP et TAZ, tandis que dans le cas d'une densité réduite en cellules YAP et TAZ était localisée plutôt dans le noyau (Aragona et al., 2013) (Zhao et al., 2007).

Des études récentes de la littérature montrent que la structure et la dynamique intégrées des microfilaments au niveau de la cellule jouent un rôle central dans la régulation de l'activité YAP / TAZ. Par exemple, l'inhibition de l'assemblage de la F-actine par la tronculline A / B et la cytochalasine D (Zhao et al., 2007) (Wada et al., 2011) (Sansores-Garcia et al., 2011), entraîne une restriction cytoplasmique de YAP (Aragona et al., 2013). Inversement, une polymérisation accrue de F-actine conduit à une translocation nucléaire de YAP / TAZ (Sansores-Garcia et al., 2011).

Les microtubules sont également des régulateurs de la localisation de YAP et TAZ. La perturbation du cytosquelette microtubulaire par le nocodazole provoque une translocation nucléaire de YAP (Zhao et al., 2012). Ainsi, ces données suggèrent fortement que les structures cytosquelettiques peuvent assurer la médiation de la localisation YAP / TAZ.



D'autres microtubules régulatrices de Kinase comme scribble, LGL et le DGL ainsi que la Kinase B du foie (LKB) semblent être également impliquées dans la régulation de YAP (Patel et al., 2017a).

Les cellules épithéliales sont un type cellulaire pour lequel le cytosquelette est très important pour sa fonction. Plusieurs molécules impliquées dans la polarité apico-basal et des protéines de jonction, parmi ces molécules la protéine crumbs, les AMOT, les caténines et les zona occludine 1 et 2 ont été rapportées dans la localisation de YAP (Schlegelmilch et al., 2011) (Varelas et al., 2010) (Halder and Johnson, 2011).

Par exemple, l' $\alpha$ -caténine, une protéine de jonction adhérente qui relie les cadhérines au cytosquelette d'actine, inhibe l'accumulation nucléaire de YAP (Schlegelmilch et al., 2011) (Silvis et al., 2011). Il a également été rapporté que YAP interagissait avec ZO-1 et ZO-2, les protéines généralement présentes dans la jonction étroite, facilitant ainsi la localisation de YAP dans le noyau (Oka et al., 2012) (Oka et al., 2010). ZO-1 peut également former un complexe tripartite avec ZO-2 et YAP, mais la localisation de ZO-1 change en fonction du type de cellule (Oka et al., 2010) (Remue et al., 2010). Fait intéressant, ZO-2 agit comme un régulateur négatif de TAZ en provoquant sa translocation dans le cytoplasme (Remue et al., 2010).

Des travaux récents ont montré que la surexpression de YAP dans les hépatocytes favorise la formation d'une structure d'actine contractile qui déstabilise les jonctions cellulaires comme l'E-cadhérine (Bai et al., 2016). L'inactivation de TAZ *in vitro* réduit l'invasion cellulaire et entraîne une augmentation de l'expression de l'E-cadhérine (Xiao et al., 2015). Cette interaction entre YAP / TAZ et le cytosquelette cellulaire a des implications importantes pour l'organisation cellulaire et l'homéostasie des tissus (Apte et al., 2009).

### 5-3-2- Régulation YAP / TAZ par détection de nutriments :

Des études récentes ont révélé que les voies métaboliques et de détection des nutriments étaient capables d'influencer l'activité de YAP et TAZ (Santinon et al., 2016). Les statines, une catégorie de médicaments diminuant le cholestérol, est capable d'inhiber la voie du mévalonate en ciblant la HMG-CoA réductase, une enzyme clé de la voie. L'inhibition de HMG-CoA a pour conséquence une inhibition de l'activité de RhoA et induit par la suite une inhibition de la transduction de YAP et de TAZ dans le noyau (Sorrentino et al., 2014) (Wang et al., 2014).

De plus, le métabolisme du glucose est capable de réguler l'interaction des membres de la famille TEAD et de YAP / TAZ. L'inhibition de la glycolyse par le traitement du 2-désoxy-glucose via PFK1, bloque l'interaction nucléaire entre YAP / TAZ et TEAD (Enzo et al., 2015). De même, l'activation de l'AMPK par le biais d'un stress énergétique ou une privation de glucose, pourrait inhiber l'interaction entre YAP et TEAD en phosphorylant directement la protéine YAP ou par l'intermédiaire de l'activité d'AMOTL1 et de LATS1 / 2 (DeRan et al., 2014) (Wang et al., 2015b).

### 5-3-3-Signalisation médiée par les récepteurs :

Un des modèles d'atteintes hépatiques par ligature des canaux biliaires est caractérisé par une prolifération très importante du compartiment cholangiocytaire et de la formation d'une réaction ductulaire. Ces observations laissent suggérer que l'un des composants de la bile est capable de stimuler cette prolifération cholangiocytaire. Des études réalisées par Sayeepriyadarshini Anakk et al, ont permis de démontrer le mécanisme moléculaire par lequel les acides biliaires étaient capables de réguler l'activité de YAP. Leurs études ont été menées sur un modèle transgénique déficient aux récepteurs nucléaires FXR et SHP qui conduisent à une accumulation d'acides biliaires dans le parenchyme hépatique de façon spontanée. Les

résultats obtenus par cette étude démontrent une augmentation de l'expression de YAP dans les hépatocytes par l'intermédiaire de la protéine IQGAP1. L'augmentation de l'expression de IQGAP1 était suffisante à elle seule pour induire l'activation de YAP et sa translocation nucléaire au niveau hépatocytaire (Anakk et al., 2013).

Les récepteurs couplés à la protéine G sont également capables de moduler l'activité de YAP, même si au niveau hépatique son implication n'est pas bien décrite (Yu et al., 2012) (Miller et al., 2012). Parmi les molécules identifiées, nous retrouvons l'œstrogène, l'épinéphrine, la sphingosin 1 phosphate ainsi que des ligands Wnt notamment Wnt3a, Wnt5a et Wnt5b (Mo et al., 2012) (Park et al., 2015).

Dans la littérature, beaucoup d'autres régulateurs de la voie Hippo ont été mis en évidence. Outre que les mécanismes décrits en aval, d'autres facteurs comme l'activation et l'interaction des voies de signalisation diverses et variées sont impliquées dans la translocation ou la rétention de YAP et TAZ dans la cellule. Cependant, peu de données existent sur la régulation transcriptionnelle de YAP et de TAZ. La majorité des régulateurs pouvant influencer la voie Hippo a bien été énumérée par Kodaka & Hata (Kodaka and Hata, 2015) (Tableau 2).

Tableau 2: Régulateurs directs et indirects de YAP1 et TAZ (Kodaka and Hata, 2015)

Category	Name	Effect on YAP1 and/or TAZ	Brief description
Cell adhesion molecule	Fas4	Down	Protocadherin
	DCHS1	Down	Protocadherin
	CD44	Up	Hyaluronan receptor
Receptor	Gs-coupled receptor	Down	Mediated by PKA and Rho
	G12/13-, Gq/11-, G $\beta$ / $\alpha$ -coupled receptor	Up	Mediated by Rho
Membrane-associated protein, cell junction protein	LIF receptor	Down	Mediated by Scribble
	Merlin/NF2	Down	Interacts with $\alpha$ -catenin and Par3
	FRMD6/Willin	Down	Putative homolog of <i>Drosophila</i> expanded
	KIBRA	Down	Interacts with Merlin, AMOT, PTPN14, and LATS kinases
	AMOT (AMOT-p80, AMOT-p130, AMOTL1, AMOTL2)	Down or up	Interacts with Patj, Merlin, and Rich AMOT-p130, AMOTL1, and AMOTL2 interact with YAP1 and TAZ
	Ajuba (Ajuba, LIMD1, WTIP)	Down or up	All three interact with LATS kinases. LIMD1 reduces YAP1 phosphorylation in MDCK cells, while Ajuba increases it in mesothelioma cells
Actin cytoskeleton	ZO-2	Down (TAZ) or up (YAP1)	Interacts with YAP1 and TAZ and promotes nuclear localization
	PTPN14	Down	Interacts with YAP1
	$\alpha$ -Catenin	Down	Blocks dephosphorylation of YAP1
	High mechanical stress	Up	Rho and CDC42 activation
	Low mechanical stress	Down	F-actin capping/severing proteins
Cross-talk with other signaling pathway	Wnt pathway	Up	Phosphorylated $\beta$ -catenin promotes TAZ degradation Wnt signaling increases PP1A-dependent dephosphorylation of TAZ
	Sonic hedgehog pathway	Up	$\beta$ -Catenin mutant stabilizes YAP1 Sonic hedgehog increases nuclear YAP1 via IRS
Others	LKB1	Down	Mediated by Scribble, MARK, and LATS2
	ILK	Up	Inhibits Merlin via MYPT1-PP1
	PP2A	Up	Dephosphorylates YAP1
	TAO-1	Down	Activates MST2
	SIK	Up	Phosphorylates WW45
	RASSF	Down	RASSF1A, RASSF2, and RASSF5 function as upstream regulators of the Hippo pathway. RASSF6 works as a tumor suppressor in parallel to the Hippo pathway. RASSF4 may have a similar mode of function
	NPHP4	Up (TAZ)	Inhibits the interaction between LATS1 and TAZ
	NPHP9	Up (TAZ)	Translocates TAZ into the nucleus
	ASPP1	Up (YAP1)	Blocks the interaction between YAP1 and LATS1
	ASPP2	Up (TAZ)	Promotes the interaction between TAZ and PP1A
	HIPK2	Up (YAP1)	Increases YAP1 independently of LATS kinases
	ANKHD1	Up (YAP1)	Forms a complex with YAP1 and is necessary for YAP1 full activity
	PML	Up (YAP1)	Stabilizes YAP1 by sumoylation and enhances p73-dependent transcription
	WRN	Down (YAP1)	Suppresses YAP1 expression

#### 5-4- Hippo/YAP dans le développement :

Le rôle de YAP et de TAZ au cours du développement est très important. Les souris Knock-out pour Yap décèdent au jour embryonnaire 8.5 à cause des malformations du sac vitellin au cours de la vasculogénèse et de la formation de l'attachement chorioallantoïque (Morin-Kensicki et al., 2006). Une souris Knock-out pour TAZ décède plutôt à cause de Kystes rénaux ou d'emphysème pulmonaire (Hossain et al., 2007) (Makita et al., 2008).

L'expression du gène YAP est présente dans toutes les cellules du compartiment hépatique, cependant sa traduction post transcriptionnelle et son activité sont les plus présentes dans le compartiment cholangiocytaires (Li et al., 2012) (Bai et al., 2012a). La délétion de YAP dans les modèles murins a pour conséquence une hypoplasie des canaux biliaires qui diminue au cours de leurs développements conduisant ainsi à la formation d'une fibrose hépatique probablement en raison de la cholestase du système biliaire immature (Zhang et al., 2010).

Les études visant à identifier le rôle des composantes de la voie Hippo/Yap au cours du développement hépatique sont très limitées, notamment à cause de la pertinence des modèles murins. L'utilisation des souris « albumine cre » est le modèle de base utilisé pour invalider de manière spécifique au niveau d'un hépatocyte mature les composants de la voie Hippo. Cependant, l'utilisation de ce modèle semble avoir un faible impact sur les hépatoblastes embryonnaires, ce qui rend l'interprétation des résultats très compliquée.

Néanmoins, des données de la littérature démontrent que l'invalidation des kinases LATS1/2 au cours du développement embryonnaire induit une expansion anormale des précurseurs des voies biliaires au dix-septième jour de gestation en faveur de l'expansion hépatocytaire. De même, la culture in-vitro des hépatoblastes issus des foies de ces souris,

révèle une tendance très importante de leurs différenciations en cellules cholangiocytaires qu'en cellules hépatocytaires (Lee et al., 2016).

#### 5-5- YAP / TAZ favorise la dédifférenciation cellulaire en cellules souches :

L'accumulation des données de la littérature démontrent que YAP/TAZ sont capables de promouvoir un programme de dédifférenciation des cellules épithéliales en cellules souches pluripotentes.

Une analyse génomique des cibles de liaison YAP / TAZ a démontré qu'ils étaient capables d'induire l'expression de gènes cibles comme étant des marqueurs de cellules souches en se liant à leurs promoteurs 139. Parmi ces gènes cibles, nous retrouvons les marqueurs pluripotents comme SOX2, NANOG, OCT4 et MYC (Lian et al., 2010).

L'expression de YAP et de TAZ est en effet enrichie dans diverses populations de cellules souches in vivo et in vitro (Moya and Halder, 2016). L'analyse histologique réalisée par exemple sur des embryons humains, révèle une localisation de YAP au niveau nucléaire des cellules composant l'embryon à l'étape blastocyste (étape de formation des cellules souches)(Qin et al., 2016). De même, l'étude des embryons murins à cette même étape, démontre de manière étonnante une localisation nucléaire de YAP uniquement dans le trophoblaste constitué de cellules souches mais non pas dans la partie embryoblaste de l'embryon (Quinn et al., 2006). La culture in-vitro dans des conditions de non différenciation des cellules embryonnaires murines et humaines démontrent des taux très élevés de YAP. La reprogrammation des cellules somatiques qui n'expriment pas YAP en cellules souches permet une restauration de son expression (Lian et al., 2010). D'autres études ont montré que la surexpression de YAP ou l'inactivation des MST dans les cellules souches embryonnaires de souris permettent leur expansion même en condition de différenciation en culture (Lian et al., 2010) (Li et al., 2013).

Les études in-vivo ont démontré qu'une activation accrue de YAP et TAZ provoque une prolifération et une expansion anormale des cellules souches dans différents organes et tissus notamment au niveau du cerveau, de l'intestin, du poumon, de la peau et de la trachée (Levy et al., 2008) (Han et al., 2015) (Cai et al., 2010) (Volckaert et al., 2017) (Zhao et al., 2014). Par suite et à l'issue de toutes ces observations, YAP et TAZ semblent jouer un rôle très important comme facteur de reprogrammation cellulaire en inhibant la différenciation des cellules souches in-vitro et in-vivo.

Une étude réalisée par Yimlamai et al pour déterminer le rôle de YAP dans la régénération hépatique dans un modèle murin à système inductible a démontré que la voie Hippo influençait la différenciation des HPC mais également le devenir des hépatocytes.

Cette étude a démontré que YAP dans un contexte normal était exclusivement exprimé au niveau des cellules biliaires et des HPCs et non pas au niveau des hépatocytes. Leurs résultats démontrent qu'une activation de YAP au niveau hépatocytaire conduit à la formation d'une réaction ductulaire et une prolifération des HPCs envahissant le parenchyme hépatique. Les résultats histologiques obtenus dans leur modèle murin semblent mimer l'histologie de l'HA (Yimlamai et al., 2014a). Cette étude a démontré qu'une activation de YAP dans les hépatocytes murins induit une dédifférenciation des hépatocytes en HPCs et en cholangiocytes. Cette même étude a également démontré qu'une activation renforcée de la voie YAP dans les cellules CK19+ induit une réaction ductulaire et une hyperplasie induite par la différenciation des HPCs en cholangiocyte. Cette étude a démontré une certaine plasticité de l'hépatocyte qui serait capable de se dédifférencier en HPC et de se redifférencier en hépatocyte en fonction de l'expression et de l'activité de YAP.

## 5-6- La voie Hippo/YAP est un acteur essentiel dans la fibrose :

L'activation de YAP / TAZ est capable de favoriser la fibrose tissulaire en régulant l'activation des myofibroblastes.

Des études réalisées chez la souris et l'homme sur les myofibroblastes et les cellules étoilées de tissus fibrotiques rénaux, hépatiques et pulmonaires ont montré une activation et une accumulation nucléaire de YAP (Mannaerts et al., 2015) (Liu et al., 2015) (Liang et al., 2017). Le traitement CCl4 pour induire une atteinte hépatique ou une obstruction unilatérale de l'uretère pour induire une atteinte rénale provoque une translocation de YAP dans le noyau des fibroblastes résidants et des cellules étoilées. L'activation de ces cellules était en corrélation avec l'expression génique impliquée dans le remodelage de l'ECM, du cytosquelette d'actine et de la prolifération cellulaire. D'une façon très intéressante, des gènes les plus fortement régulés dans l'étude de Mannaerts et al étaient des cibles directes de YAP dont *Ankrd1* et *CTGF* (Mannaerts et al., 2015).

*Ankrd1* est un facteur de transcription mécanosensible exprimé en réponse à une atteinte tissulaire et assure la signalisation de TGF- $\beta$  tandis que le *CTGF* est une protéine impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire qui régule l'expression des gènes tels que la fibronectine, les collagènes de types I, III, IV et VI et la liaison à divers récepteurs de la surface cellulaire comme certaines intégrines telle que  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 1$  (Lau, 2016).

Le *CTGF* est un facteur de transcription qui favorise l'activation et l'expansion des cellules étoilées et par suite dans la survenue des profils fibrotiques (Huang and Brigstock, 2012). De manière surprenante, l'expression de *Ankrd1* et de *CTGF* était beaucoup plus importante de *Acta2*, le marqueur le plus utilisé pour évaluer l'activation des cellules étoilées.



Une injection de fibroblastes humains exprimant un YAP ou TAZ constitutivement actif chez des souris immunodéprimées provoque un remodelage de la composition de l'ECM ainsi que de la fibrose pulmonaire (Liu et al., 2015).

Inversement, l'inhibition de YAP au niveau des cellules étoilées hépatiques et des fibroblastes rénaux induit un blocage de l'évolution de la fibrogenèse, ces résultats démontrent un rôle essentiel de YAP dans la progression et la survenue de la fibrose par le biais de l'activation des myofibroblastes résidents (Mannaerts et al., 2015) (Liang et al., 2017).

#### *5-7- Hippo/YAP interagit avec des voies de signalisation importante dans le processus de régénération*

Plusieurs voies de signalisation ont été décrites pour interagir avec la voie de signalisation Hippo/YAP (Figure 12). De plus, Yimlamai et al ont démontré dans leurs études une influence de l'activation de YAP sur l'expression d'acteurs de la voie NOCTH notamment Notch2 et JAG1. La voie de signalisation Notch est impliquée dans plusieurs processus physiologiques notamment dans le développement embryonnaire, la prolifération cellulaire, la spécification et la différenciation. Chez les mammifères, la voie Notch est constituée de quatre récepteurs Notch 1, 2, 3 et 4 et de deux familles de ligands : Jagged-1 et 2 ; et Delta-like ligand-1, 3 et 4 (DLL1, DLL3 et DLL4). La voie de signalisation Notch implique une interaction d'un ligand présent à la membrane d'une cellule donatrice du signal et d'un récepteur sur la membrane d'une cellule réceptrice. L'activation induite ainsi, entraîne le clivage protéolytique de la partie intracellulaire du récepteur Notch (NICD) et sa translocation nucléaire pour réguler l'expression de certains gènes. L'implication de la voie Notch et son importance dans le processus de remodelage des voies biliaires ont été décrites

dans plusieurs modèles de souris mutantes et dans des maladies génétiques humaines. En effet, le syndrome d'Alagille chez l'homme, est une maladie autosomique caractérisée par une cholestase chronique qui est secondaire à une mutation du ligand JAG1 ou du récepteur Notch2, des acteurs de la voie Notch (Oda et al., 1997) (McDaniell et al., 2006).

Les voies Hippo, Wnt et Notch sont 3 voies de signalisation très impliquées dans le cancer du foie (Harvey et al., 2013) (de La Coste et al., 1998) (Villanueva et al., 2012). Des études de la littérature démontrent une interaction entre ces trois voies de signalisation avec la voie YAP comme étant la voie centrale capable d'inhiber la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et d'activer la voie Notch (Hong et al., 2016).

Une étude récente s'intéressant à la tumorigenèse hépatique a utilisé des modèles de souris transgéniques pour mettre en évidence un lien étroit entre la sévérité du cancer et la voie activée (Kim et al., 2017). Cette étude a notamment utilisé un modèle de souris TKO- $\beta$ -caténine (Alb-Cre Mst1<sup>-/-</sup> Mst2<sup>fl/fl</sup> Ctnnb1<sup>fl/fl</sup> mice) pour lequel les voies Hippo et Wnt/ $\beta$ -caténine étaient inactivées alors que la voie Notch était activée secondairement à l'activation de YAP. Ces souris étaient caractérisées par une hypertrophie hépatique ainsi qu'un aspect irrégulier du foie. Sur le plan histologique ces souris étaient caractérisées par une réaction ductulaire importante et une prolifération d'HPC qui envahissaient le parenchyme hépatique. Ces caractéristiques obtenues sont proches de celles qu'on retrouve dans le foie des patients HA.

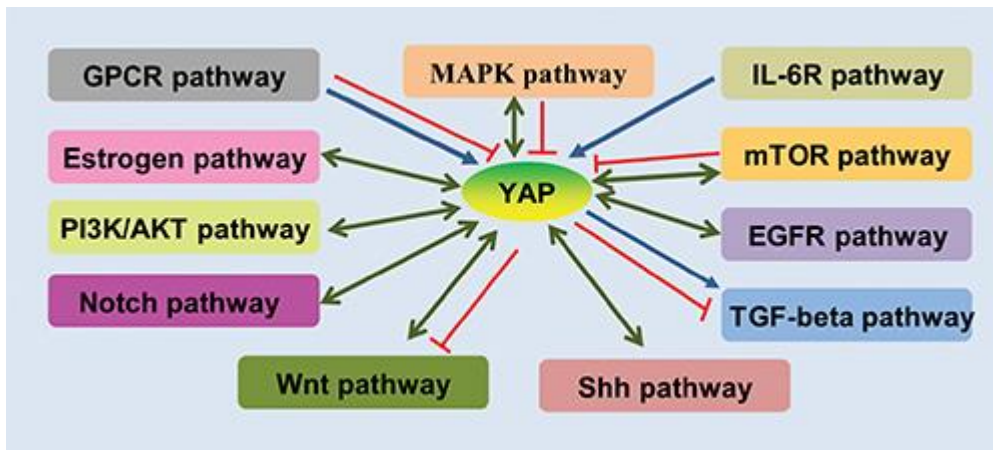


Figure 13: Interaction de la voie Hippo/YAP avec d'autre voie de signalisation (Ou et al., 2017)

La voie de GPCR active ou inhibe YAP; La voie des œstrogènes inhibe YAP et YAP active la voie des œstrogènes; La voie PI3K / AKT active YAP et YAP active également la voie PIK / AKT; La voie Notch active YAP et YAP active également la voie PIK / AKT; La voie Shh active YAP et YAP active également la voie Shh; La voie Wnt active YAP et YAP active ou inhibe la voie Wnt; YAP active ou inhibe la voie du TGF-bêta; La voie EGFR active YAP et YAP active également la voie EGFR; La voie mTOR active ou inhibe YAP et YAP active la voie mTOR; La voie IL-6R active YAP; La voie MAPK active ou inhibe la YAP et la YAP active la voie MAPK.

### 5-8- Modulateur thérapeutique de la voie Hippo :

Depuis la découverte de la voie de signalisation Hippo et son implication dans divers processus physiopathologiques notamment dans le cancer, le nombre de recherches visant à mettre au point des modulateurs pharmacologiques pour inhiber les acteurs de cette voie n'ont fait qu'augmenter.

Le premier inhibiteur de YAP décrit dans la littérature était issu des travaux réalisés par Liu-Chittenden et son équipe en 2012. Cet inhibiteur nommé Verteporfine, avait pour conséquence de réduire in-vivo la survenue et l'évolution tumorale chez des souris transgéniques où la voie Hippo est dérégulée (Liu-Chittenden et al., 2012). La Verteporfine a pour rôle d'inhiber l'interaction de YAP avec le TEAD2 et par suite limiter l'évolution pathologique induite par une suractivation de YAP. Cependant, la toxicité cellulaire due à des

effets non ciblés ainsi que la production de radicaux oxygène réactifs lors d'une activation par la lumière ont empêché la transition de la Verteporfine en traitement du cancer (Konstantinou et al., 2017).

L'ivermectine, un antiparasitaire, a récemment été identifiée comme un inhibiteur de la transcription dépendante de YAP / TEAD et a été utilisée avec succès pour inhiber l'activation de YAP et la prolifération hépatique dans les foies déficients en Mob1a/1b. Bien que le mécanisme d'inhibition de YAP par l'ivermectine ne soit pas entièrement compris à ce jour, le composé semble avoir un bon profil d'innocuité, qui fait de lui un médicament prometteur pour l'inhibition in vivo de la YAP (Nishio et al., 2016).

Dans les cellules d'adénocarcinome oesophagien, CA3 - un nouvel inhibiteur de la transcription dépendante de YAP / TEAD - a permis de réduire la croissance des cellules tumorales en association avec une chimiothérapie établie (Song et al., 2018). Cependant, ce composé n'a pas encore été testé dans le foie. Outre les inhibiteurs directs de YAP / TAZ, plusieurs études (Bae et al., 2017) ce sont intéressées à des composés qui ciblent les régulateurs en amont de la signalisation Hippo.

La dobutamine, une amine sympathomimétique utilisée comme agent inotrope dans l'insuffisance cardiaque, favorise la phosphorylation de YAP sur le site S127 par le biais de la signalisation de PKA et la rétention cytoplasmique de YAP, confirmant ainsi la suppression de l'activité de transcription in vitro de YAP-TEAD probablement impliquée dans la régulation de F-actin par Rho GTPases, ainsi que d'autres GPCR (Bao et al., 2011).

Dans la littérature beaucoup d'autres inhibiteurs de YAP ont été décrits notamment au niveau de littérature qui a essayé de recenser tous ces inhibiteurs et leurs actions dans la modulation de la voie Hippo. Ces modulateurs ont été bien décrits par Bae et al dans un tableau récapitulatif ci-joint (Tableau 3) (Bae et al., 2017).

Tableau 3 : Inhibiteur de YAP

Inhibitors/ agonist	Target	Effects	Refs.
Verteporfin	YAP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Binding to YAP to inhibit the interaction of YAP with TEAD and its transcriptional activity</li> <li>• Suppressing liver overgrowth caused by YAP overexpression or NF2 inactivation</li> </ul>	[127]
Dasatinib	YES1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibiting the tyrosine 357 phosphorylation of YAP</li> <li>• Inhibiting interaction of YES1, YAP, and <math>\beta</math>-catenin complex independent of YES1 kinase activity</li> <li>• Inhibition of gut formation to a similar extent as the YAP or YES1 knockdown</li> <li>• Impeding <math>\beta</math>-catenin-dependent proliferation of colon cancer cell lines.</li> </ul>	[111]
Y27632	ROCK		[20, 22]
Blebbistatin	non-muscle myosin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition of YAP/TAZ nuclear localization and transcriptional activity</li> </ul>	
Latrunculin A	F-actin		
Latrunculin B	F-actin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition of nuclear YAP localization via enhanced LATS activity</li> </ul>	[25]
Cytochalasin D	F-actin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibits nuclear YAP localization via enhanced LATS activity and reduces TEAD-dependent transcriptional activity</li> </ul>	[22, 23, 25]
Botulinum toxin C3	Rho	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elevates phosphorylation of YAP/TAZ and blocks LPA- and S1P-induced YAP/TAZ dephosphorylation</li> <li>• Inhibits YAP/TAZ nuclear localization and transcriptional activity.</li> </ul>	[20, 25]
Dihydroxidine	Dopamine receptor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increase of YAP phosphorylation</li> </ul>	[25]
Dobutamine	G protein-coupled $\beta$ -adrenergic receptor agonist	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induction of cytoplasm accumulation of GFP-YAP and YAP S127 phosphorylation</li> <li>• Inhibiting YAP-dependent transcriptional activity independent of Hippo core kinases</li> </ul>	[128]
Rolipram			[52]
Ibudilast	Phosphor-diesterase 4, adenylyl cyclase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induction of YAP/TAZ phosphorylation dependent on LATS 1/2 kinase activity</li> <li>• Inhibiting YAP-dependent transcriptional activity</li> </ul>	
IBMX			
Theophylline			
Forskolin			
LY294002		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blocking dissociation of PDK1 from Hippo core components in response to EGF treatment.</li> </ul>	[54]
PDK1 inhibitor II	PI3K, PDK1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibiting YAP dephosphorylation, nuclear accumulation and transcriptional activity</li> </ul>	
Statins	HMG-CoA reductase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimulation of hippo signaling via increasing phosphorylation level of Mst1/2 and Lats1 kinase</li> </ul>	[88–90]
GGTI-298	Geranylgeranyl transferase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduces of TAZ expression and enhances YAP S127 phosphorylation</li> <li>• Blocking YAP nuclear localization and transcriptional activity</li> </ul>	
Zoledronic acid	Farnesyl diphosphate synthase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rescue of eye overgrowth induced by Yki overexpression in drosophila</li> </ul>	
Simvastatin	Receptor for RHAMM transcription.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibiting YAP-TEAD binding to RHAMM (hyaluronan-mediated motility) promoter</li> </ul>	[90]
Ivermectin	Unknown	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibiting YAP dephosphorylation, nuclear accumulation and transcriptional activity</li> </ul>	[63]
Milbemycin D		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduction of hepatomegaly and accumulation of improper differentiated cells in Mob1-deficient mice liver</li> </ul>	

**BUT DU TRAVAIL**

L'hépatite alcoolique est une maladie dont la physiopathologie est très mal connue à ce jour. L'arsenal thérapeutique pour le traitement des patients HA est limité à un traitement corticoïdes avec un pourcentage élevé (40%) de patients qui ne répondent pas au traitement et pour lesquels le taux de mortalité est extrêmement élevé (environ 80%). Les raisons de cette méconnaissance de la pathogenèse de l'HA ainsi que de la pauvreté de l'arsenal thérapeutique sont :

- L'incapacité des modèles animaux de reproduire le spectre des lésions de l'HA (stéatose, infiltrat PNN, réaction ductulaire...)
- L'accès difficile à des échantillons humains suffisants pour développer des approches translationnelles approfondies.

Grâce à une étude évaluant l'intérêt de la transplantation précoce de patients HA résistants au traitement médical, notre laboratoire a accès à des échantillons uniques pour développer une recherche translationnelle de qualité. Ces échantillons nous ont permis d'être les premiers à décrire un profond déficit de la régénération hépatique chez les patients HA. Nos données démontraient une incapacité des hépatocytes à proliférer et donc rétablir un équilibre hépatique fonctionnel. La présence d'une réaction ductulaire envahissant le parenchyme hépatique au cours de l'HA suggérait l'incapacité des HPC à donner des hépatocytes matures et se différenciant plutôt cholangiocytes.

Dans la présente étude, nous avons exploré les mécanismes cellulaires à l'origine de cette régénération biaisée dans l'HA en ciblant différentes voies de signalisation pouvant affecter la prolifération et la différenciation hépatocytaire. Nous avons pu mettre en évidence une importante dérégulation de la voie de signalisation Hippo/YAP dans le foie de patients HA. Nos résultats démontrent pour la première fois, dans une pathologie humaine non cancéreuse, une activation aberrante de YAP au niveau hépatocytaire responsable d'une dédifférenciation

de ces cellules au profit de cellules exprimant des marqueurs biliaires. Nous avons également montré qu'un traitement à la Dobutamine (inhibiteur de YAP) sur des hépatocytes provenant de patient HA était capable de limiter le processus de dédifférenciation en diminuant l'expression des gènes biliaires.

Il est aujourd'hui admis que les PNN seraient des acteurs clés dans la physiopathologie de l'HA puisqu'ils envahissent le parenchyme hépatique au cours de la maladie. Cependant, peu d'études ont exploré le PNN dans l'HA. C'est pourquoi nous avons décortiqué les fonctions et mécanismes cellulaires des PNN au cours de l'HA.

Nous avons donc, dans un premier temps, évalué dans un modèle d'ischémie reperfusion, le dialogue entre PNN et hépatocyte en s'intéressant à la voie NOD1 décrite pour intervenir dans la survenue des lésions hépatiques induites dans par le PNN. Nos résultats ont permis d'identifier les mécanismes par lesquels NOD1 conduisait à l'expression de molécules d'adhérence au niveau de l'hépatocyte et favorisant ainsi les interactions entre PNN et hépatocytes.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une étude fonctionnelle des PNN circulants. Etant donné la corrélation décrite par notre groupe entre la mortalité des patients HA et la survenue des épisodes infectieux (Louvet et al., 2009), nous avons évalué la voie IL33 connu pour influencer l'état infectieux et le pronostic des patients souffrant de sepsis. Nous démontrons ainsi un dysfonctionnement de la voie IL33/ST2 au niveau des PNN de patients HA par rapport aux PNN de patients cirrhotiques et aux patients contrôles. Ce dysfonctionnement avait pour effet une diminution de la capacité migratoire des PNN des patients HA en partie réversible par le traitement de ces derniers par l'IL33.



# TRAVAUX PERSONNELS

1- Loss of hepatocyte identity under aberrant YAP activation as a central mechanism of alcoholic hepatitis pathogenesis

**Loss of hepatocyte identity under aberrant Yes-associated protein (YAP) activation as a central mechanism of alcoholic hepatitis pathogenesis**

**Authors:** Mohamed Bou Saleh<sup>1</sup>, Guillaume Lassailly<sup>1,2</sup>, Viviane Gnemmi<sup>3</sup>, François Maggiotto<sup>1</sup>, Massih Ningarhari<sup>1,2</sup>, Florent Artru<sup>1,2</sup>, Emmanuel Boleslawski<sup>4</sup>, Emilie Anglo<sup>1</sup>, Pau Sancho Bru<sup>5</sup>, Stéphanie Truant<sup>4</sup>, Anne Corlu<sup>6</sup>, Josepmaria Argemi<sup>7</sup>, Julie Dubois-Chevalier<sup>8</sup>, Sébastien Dharancy<sup>1,2</sup>, Jérôme Eeckhoutte<sup>8</sup>, Ramon Bataller<sup>7</sup>, Philippe Mathurin<sup>1,2</sup>, Alexandre Louvet<sup>1,2</sup>, Laurent Dubuquoy<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> LIRIC – Lille Inflammation Research International Center – U995, Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, F-59000 Lille, France.

<sup>2</sup> Service des Maladies de l'Appareil Digestif et de la Nutrition, CHU Lille, F-59000 Lille, France.

<sup>3</sup> Service d'anatomopathologie, CHU Lille, F-59000 Lille, France.

<sup>4</sup> Service de chirurgie adulte et transplantation, CHU Lille, F-59000 Lille, France.

<sup>5</sup> Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Catalonia, Spain.

<sup>6</sup> INSERM, Univ Rennes, INRA, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolisms and Cancer), Rennes, France.

<sup>7</sup> Division of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Pittsburgh Liver Research Center. University of Pittsburgh Medical Center (UPMC), Pittsburgh, PA.

8 U1011 - EGID, Univ. Lille, Inserm, Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France.

**Key words:** hepatocyte, Hippo/YAP, dedifferentiation, alcoholic hepatitis,

**Contact Information :**

Laurent Dubuquoy, Ph. D. LIRIC – UMR995, 4<sup>e</sup> étage Est, Faculté de Médecine - Pôle Recherche, 1 Place Verdun, 59045 Lille Cedex, France. Email: [laurent.dubuquoy@inserm.fr](mailto:laurent.dubuquoy@inserm.fr); phone: +33 3 20974208, fax: +33 3 20623525

**Electronic word count:**

**List of abbreviations:** Alcoholic hepatitis (AH), Alcoholic liver disease (ALD), phosphate buffer saline (PBS), paraformaldehyde (PFA), Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF), polymorphonuclear neutrophil (PMN), Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), relative units (RU), sodium dodecyl sulphate (SDS), wild-type (WT), Yes-associated protein (YAP).

**Disclosure:** The authors declare no conflict of interest in relation to this manuscript.

**Financial support:** The author acknowledges funding support from the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism grant 1U01AA021908, AFEF, program Region Haut de France.

**Ethics committee number for human research:** CPP14/67

**Ethics committee number for animal experiments:** n° 01757.01

**Abstract:**

Alcoholic hepatitis (AH) is the most severe form of alcoholic liver disease. The lack of reliable animal models has dampened our knowledge on its pathogenesis. Recent studies demonstrate an altered liver regeneration associated with a profound defect in functional hepatocytes. The present work aimed at understanding cellular defects in hepatocyte biology during AH pathogenesis.

To this aim we used a unique set of patient undergoing early liver transplantation for AH. Our study identifies Yes-associated protein (YAP), the effector downstream the Hippo pathway, as aberrantly activated in AH hepatocyte, leading to the loss of hepatocyte identity and the dampened regeneration in AH.

## **Introduction:**

Alcoholic liver disease (ALD) is a leading cause of liver-related mortality worldwide. In contrast to recent advances made for viral hepatitis therapy, there is an important lack of therapeutic options for patients with ALD. This is particularly true for alcoholic hepatitis (AH) where there is an urgent need to develop effective therapies (Mandrekar et al., 2016). Indeed AH is the most severe form of ALD that induces up to 40% of premature death within 6 months after its onset (Lucey et al., 2009). Animal models and experimental data have highlighted intra-hepatic inflammation as the main cause of AH liver failure. Consequently, therapies have been developed to target inflammatory mediators but with very limited efficacy (Louvet and Mathurin, 2015). In AH, the failure of therapeutic development strategies based on targets identified from animal models highlights the many limitations of these.

The early liver transplantation program in highly selected patients with severe AH permitted access to valuable human liver samples (Mathurin et al., 2011). Recent studies, based on such material, revealed bilirubinostasis, ductular reaction and impaired hepatocyte regeneration as new research axes to decipher the unknown mechanisms of liver failure in AH (Dubuquoy et al., 2015b).

Among several pathways involved in hepatocellular regeneration, Hippo/YAP pathway appears as promising. In mouse, it has been shown to regulate the cell proliferation and the liver size (Patel et al., 2017b) (Zeng and Hong, 2008). Indeed, inactivation of the Hippo pathway in mouse liver leads to nuclear translocation of YAP, a transcription cofactor, and its activation resulting in an increase in liver size (Patel et al., 2017b). This observation of hepatic hypertrophy is also found in patients with AH.

Camargo et al have demonstrated that activation of YAP specifically in hepatocyte led to the formation of a ductal reaction (Yimlamai et al., 2014b) comparable to this observed in AH (Dubuquoy et al., 2015b) (Sancho-Bru et al., 2012).

The present human-based translational study addresses, together with animal models, the role of the Hippo/YAP pathway in severe AH. We demonstrate that Hippo/YAP pathway is the keystone in the hepatocellular and regeneration defects characteristic of AH. Our results showed an aberrant YAP activation in AH hepatocyte that led to the loss of their hepatocyte signature in favor of a cholangiocyte identity. This study supports Hippo/YAP pathway as a new promising therapeutic target to overcome liver failure in AH.

## **Results:**

### **Hippo/YAP pathway is deregulated in AH liver**

To better characterize cellular mechanisms involved in AH pathogenesis we have used a comprehensive analysis of liver RNA sequencing (RNA-seq) data from a large series of patients (Argemi et al., 2019) with different disease stages including normal liver (Normal, n=10), early alcoholic steatohepatitis (eASH, n=12), AH with liver failure (AH, n=18) and explants from patients with AH who underwent early liver transplantation (exAH, n=10) (Dubuquoy et al., 2015b). Ingenuity pathway analysis revealed the Hippo pathway and its partner Notch as profoundly deregulated in AH with a greater amplitude with regards of the disease severity (Fig. 1a). To further investigate the alteration of this Hippo pathway in AH, we have compared mRNA expression of YAP, the effector of the pathway as well as its known target genes (ANKRD1, TGF $\beta$ 2 and NUA2) and cofactor (TEAD4) in liver from Ctrl, Cirrh and AH. Real-time PCR revealed a two-fold increase of YAP1 expression in liver of ALD patients (Cirrh and AH) as compared to control liver (Fig. 1b). However, YAP target genes were significantly induced in AH liver as compared to Cirrh and Ctrl (Fig. 1b). The YAP partner TEAD4 was also overexpressed in AH as compared to Cirrh and Ctrl (Fig. 1b). The analysis of the Hippo signaling pathway revealed a significant decrease in the expression level of protein kinase MST1 in AH liver as compared to Ctrl and Cirrh. When focusing on the active form of MST1 we found elevated levels in Ctrl livers and moderated levels in Cirrh livers while, in AH, its expression were completely collapsed (Fig.1c). The inactive form of MST1 was not detected in the Ctrl livers, and was essentially found in Cirrh and at a lesser extent in some AH liver (Fig. 1c). These results suggest that the Hippo signal was dampened in AH livers. In order to have a comprehensive view of YAP expression pattern, we performed YAP immuno-staining. It revealed a weak and diffuse expression of YAP in Ctrl liver, a strong expression in the ductular reaction in fibrotic strings surrounding the

regeneration nodules in Cirrh livers and an intense staining throughout the AH parenchyma. This staining appeared mainly in AH hepatocyte nucleus suggesting the activation of YAP (Fig. 1d). Taken together these data suggested that the Hippo signal is defective in AH liver, while YAP, the actor of this pathway, appeared activated in AH.

### **Nuclear YAP in AH hepatocyte is associated with expression of biliary markers**

To confirm that YAP is located in the hepatocyte nucleus in AH livers, we performed a co-staining of YAP with albumin, a hepatocyte specific marker. Ctrl and Cirrh albumin-positive cells only displayed a weak YAP staining that appears diffuse in the cytoplasm. In AH liver, an intense YAP staining was mainly localized in the nucleus of albumin-positive cells (Fig. 2a). This suggests a strong activation of YAP in AH hepatocyte.

As in mice YAP activation in hepatocyte has been associated with induction of biliary commitment, we have investigated the biliary markers SOX9 and HNF1 $\beta$  in patient livers. As expected, these two markers were found in the intrahepatic bile ducts in Ctrl livers and in the perinodular ductular reaction in the Cirrh livers. Remarkably, SOX9 and HNF1 $\beta$  are strongly expressed in virtually all hepatocytes of AH parenchyma (Fig. 2b).

The abnormal expression of biliary markers in AH hepatocytes was associated with drastic decrease in hepatocyte marker expression. Indeed, gene expression of CYP3A4, TAT, Albumin and Aldolase B were significantly decreased in AH livers as compared to Cirrh and Ctrl livers (Fig. 2c).

Some actors of the Notch pathway are targets of YAP that have been implicated in biliary commitment. AH liver displayed Notch 1-immunoreactivity on hepatocytes as well as Notch2 staining hepatocytes nucleus (Suppl Fig. 1a-b).

Taken together these data suggest a loss of hepatocyte identity in favor of a biliary phenotype.

### **AH hepatocytes transcriptome reveal a loss of hepatocyte identity**



To further assess the loss of hepatic identity suggested by individual markers, we performed transcriptomic analyses of microdissected hepatocytes from AH, Cirrh and Ctrl livers. Principal component analysis indicated that AH (YAP<sup>+</sup> cells) was linked to more profound transcriptomic alterations than Cirrh (YAP<sup>-</sup> cells) (Fig. 3a). In line, the number of differentially expressed genes (Log<sub>2</sub> fold change > 1; FDR < 0.05) was dramatically higher in AH when compared to both Ctrl and Cirrh, the difference between the 2 latest being much less pronounced (Fig. 3b). Subsequent characterization of AH-related transcriptomic alterations used Cirrh as the control group to specifically highlight changes associated with this condition. In line with our previous data, gene set enrichment analyses (GSEA) indicated that genes related to the Hippo/YAP pathway, and the downstream Notch pathway (Yimlamai et al., 2014b), displayed a significant enrichment in AH microdissected cells (Fig. 3c). To define whether this was linked to loss of the hepatic transcriptional program, we made similar analyses using gene sets defining the hepatic (Hep-ID) or cholangiocytic (Chol-ID) identities, i.e. genes whose expression characterizes best differentiated hepatocytes or cholangiocytes (Dubois V. et al, submitted) (Verhulst et al., 2019). Strikingly, AH was linked to a significant loss of Hep-ID gene expression and a concomitant enrichment for Chol-ID genes (Fig. 3d). Note that AH actually significantly exacerbates transcriptomic changes which can already be observed in Cirrh when compared to Ctrl patients (Suppl Fig. 1a). This was further evidenced by additional analyses making use of mouse hepatobiliary single-cell transcriptomic data (Yang et al., 2017). Indeed, while genes significantly more expressed in Cirrh than in AH correspond to genes highly expressed in hepatocytes, genes higher in AH when compared to Cirrh correspond to genes strongly expressed in cholangiocytes (Fig. 3e). Altogether, these transcriptomic analyses therefore further pointed out a dramatic loss of hepatocyte identity accompanied by a reciprocal gain of cholangiocytic identity genes in AH.

### **Modulation of YAP drives hepatocyte dedifferentiation**

In order to determine the role of YAP in the process of dedifferentiation and loss of hepatocyte identity, we have transfected human primary hepatocytes with a vector allowing expression of a constitutively active human YAP protein (YAPS127A, Fig. 4a).

Transfection of human primary hepatocytes with YAPS127A led to a significant induction of YAP expression as compared to mock-transfected hepatocytes. This induction of activated YAP led to a subsequent increase in mRNA expression of its target genes ANKRD1, TGF $\beta$ 2, NUA2, NOTCH2, and JAG1 (Fig. 4b). Exogenous activated YAP is associated with a drop in the expression of the hepatocytes markers CYP3A4, Aldolase b, TAT and Albumin (Fig. 4b). Conversely biliary markers (CK19 & CK7) were significantly induced (Fig. 4b).

HepaRG are bipotent cells that are differentiating into hepatocytes or cholangiocytes after a 30-day period. Immunofluorescent staining of YAP revealed a nuclear localization of YAP in undifferentiated HepaRGs (Fig. 4c). Once the cells were differentiated, biliary-type cells retained a strong YAP staining in the nucleus. By contrast, hepatocyte-type cells displayed a weak and diffuse cytosolic YAP staining (Fig. 4c). We have therefore treated HepaRG with the known YAP inhibitor, dobutamine. After a 30 day-culture, this treatment appeared to promote the hepatocyte-type differentiation of HepaRG (Fig. 4d).

Dobutamine treatment induced a decreased mRNA expression of YAP and more importantly of its target genes ANKRD1, NUA2, TGF $\beta$ 2, NOTCH2 and JAG1. This was associated with an upregulation of hepatocytes markers TAT, CYP3A4, Albumin and Aldolase B and a downregulation of biliary markers CK7 and CK19 (Fig. 4e).

All these results demonstrated that the modulation of YAP is able to influence the human hepatocyte cell fate.

**YAP activation induced hepatocytes dedifferentiation under alcohol exposure and impaired liver regeneration**

In order to define the *in vivo* consequence of YAP activation in hepatocyte under alcohol exposure, we used a validated mouse model, the modified Lieber-De-Carli model (LDC, (Louvet et al., 2011)). To induce specific hepatocyte YAP activation, mice were injected with AAV2/8-YAPS127A two weeks before LDC diet.

As expected, the LDC diet induced significantly the liver/body weight ratio (Fig. 5a). Remarkably, hepatocyte expression of the constitutively active YAP (YAPS127A) led to a significant increase of the liver/body weight ratio whereas there was no additive effect of LDC and YAPS127A expression (Fig. 5a). In mice injected with AAV-YAPS127A the human YAP gene was expressed at high levels, while mouse Yap expression was not affected by LDC diet or YAPS127A treatment (Suppl. Fig. 4a).

YAP immunostaining of mice liver showed that the *in vivo* transduction of YAPS127A to induction of YAP expression and nuclear localization in hepatocytes (Fig. 5b). This appeared comparable between mice receiving control diet (CD) or LDC diet. Liver from mice that did not receive YAPS127A displayed a YAP expression the intrahepatic biliary cells with low and diffuse expression in hepatic parenchyma (Fig. 5b).

We then investigated hepatocyte dedifferentiation by evaluating the expression of biliary markers SOX9 and HNF1 $\beta$ . Immunostaining of SOX9 showed an expression that is restricted to ductal biliary cells in the livers of mice that did not receive YAPS127A. YAPS127A-transduced mice under CD displayed a SOX9 expression in biliary cells but also in in few hepatocytes (Fig. 5b). Under LDC diet SOX9 expression appeared induced in hepatocytes with large areas of hepatocyte expressing SOX9. These results were consistent with Hnf1b gene expression that was induced in YAPS127A-transduced mice under CD and further induced in YAPS127A-transduced mice under LDC OH diet (Fig. 5c). These results

demonstrated *in vivo* YAP activation in hepatocyte led their dedifferentiation. This phenotype was significantly amplified under alcohol exposure.

We then investigated the consequences of YAP activation in hepatocyte on liver regeneration using the carbon tetrachloride model (CCl<sub>4</sub>). As observed in LDC model, YAPS127A-transduced mice displayed a significant hepatomegaly as soon as 24h and 48h after CCl<sub>4</sub> injection, and human YAP gene expression was confirmed (Suppl Fig. 4b). Noteworthy, mouse Yap expression was significantly increased between 24hrs and 48hrs after CCl<sub>4</sub> injection. (Suppl Fig. 4b). BrdU incorporation test revealed very rare proliferating hepatocytes 24hrs after CCl<sub>4</sub> injection whatever the treatment received (data not shown). Forty-eight hours after CCl<sub>4</sub> injection, liver from mice that did not receive YAPS127A displayed numerous proliferating hepatocytes while YAPS127A-transduced mice showed very low BrdU incorporation (Fig. 5d). This was confirmed by the counting of BrdU-positive hepatocytes that revealed a 77% drop in proliferating hepatocyte in the liver of injected YAPS127A-transduced mice (Fig. 5e). Induction of biliary marker (HNF1 $\beta$ ) was confirmed in this model 24hrs and 48hrs after CCl<sub>4</sub> injection (Fig. 5f).

These results suggested that constitutive activation of YAP in hepatocytes dampened liver regeneration.

### **Treatment of AH-isolated hepatocytes with a YAP inhibitor counteracted its dedifferentiation**

In order to investigate the therapeutic potential of YAP inhibition on hepatocyte dedifferentiation, we have isolated primary hepatocytes from the liver of a patient with AH and treated them with dobutamine for 24hrs (Fig. 6a).

Dobutamine treatment of AH hepatocytes decreased gene expression of YAP and more importantly of its target genes confirming at least the inhibition of its activity (Fig. 6b). This

treatment was associated with a significant decrease in the expression of the biliary markers while expression of hepatocyte markers appeared not affected (Fig. 6b).

These results suggest that YAP inhibition could limit loss of hepatocyte identity in AH.

## **Discussion:**

Despite its undeniable economical and health burden, ALD has received very limited attention from health policy makers, pharmaceutical companies, and funding agencies. The major consequence is the very limited therapeutic arsenal, particularly for AH where the tools for the patient's management have not evolved substantially over the last decades (Mandrekar et al., 2016). Animal models have been proposed to facilitate dissection of mechanisms involved in ALD. However, none of the animal models developed so far for the study of ALD are able to reproduce the full spectrum of AH (neutrophil infiltrates, regeneration defect...), while translational studies suffer from limited access to human liver samples. Recent translational studies based on unique liver samples have shown that AH pathophysiology is characterized by massive loss of hepatocyte associated with a profound alteration of liver regeneration (Dubuquoy et al., 2015b) (Sancho-Bru et al., 2012) (Lanthier et al., 2015). However, the origin of this defect is poorly understood. In the present study, we have demonstrated that the Hippo/YAP pathway is importantly deregulated in the liver of AH patients. Indeed, YAP, transcriptional cofactor that is the effector of this pathway, was shown here to be highly activated in AH hepatocytes leading to the progressive loss of hepatocyte identity in favor to the occurrence of a biliary phenotype. This dedifferentiation phenotype was confirmed *in vivo* and associated to a blockade of the hepatocyte regeneration. Finally, *ex vivo* treatment of AH hepatocyte with an inhibitor of YAP suggested the interest to target YAP in AH treatment.

Hippo/YAP pathway has been mainly studied in animal models. Available data suggest that this pathway is involved in the hepatocyte cell fate. In a physiological context, YAP is highly expressed in biliary cells. Induction of YAP activation in hepatocytes led to their dedifferentiation towards an intermediate phenotype expressing both hepatocyte and biliary cell markers (Yimlamai et al., 2014b). However, few data are available on the consequences of YAP activation in human pathophysiological context and more precisely on hepatocyte

outcome in non-cancerous diseases. A recent study have shown that activation of YAP in hepatocyte in the context of acute liver failure led to the activation of fetal liver program (Hyun et al., 2019).

The present study goes further by showing in AH liver that the Hippo signal is shut-down in hepatocytes (i.e. inactive MST1 kinase) leading to the aberrant activation of YAP and the progressive loss of hepatocyte identity. Indeed, microdissection of AH hepatocyte showed an enrichment of biliary gene signature while the hepatocyte identity genes were importantly downregulated. These results are consistent with results obtained by a recent study that has demonstrated a loss of the transcriptional activity of HNF4 $\alpha$  with, in turn, an increased expression of its fetal isoform HNF4 $\alpha$ -P2 thus leading to the loss of hepatocyte function (Argemi et al., 2019). Experimental data obtained in mouse showed that YAP could inhibit the hepatocyte differentiation program induced by HNF4 $\alpha$  and  $\beta$ -catenin (Fitamant et al., 2015). Aberrant YAP activation that we showed in AH hepatocyte could then participate to the loss of expression of HNF4 $\alpha$  in AH.

Numerous studies have shown that activation of YAP is an essential factor in liver regeneration in several murine models of hepatic injury (Liu et al., 2019)(Fan et al., 2016)(Bai et al., 2012b)(Loforese et al., 2017). Indeed YAP expression appears induced upon liver injury and repressed once regeneration is completed (Grijalva et al., 2014). However, a constitutive unregulated activation of YAP in murine hepatocytes leads to its dedifferentiation into epithelial cells with intermediate phenotype (Yimlamai et al., 2014b)(Patel et al., 2017b). Our results clearly demonstrate that this uncontrollable YAP activation is inhibitory for hepatic regeneration. This suggests that the inducing effects of YAP on hepatic regeneration imply a kinetic regulation of its expression and activation whereas the maintenance in an activation state led to the disturbance of liver regeneration.

In conclusion, this study demonstrated that aberrant activation of the Hippo/YAP pathway in hepatocyte is a key mechanism in the AH pathogenesis. This led to the loss of hepatocyte identity and impaired liver regeneration. Given the paucity of the therapeutic arsenal for AH, targeting YAP would be an original and promising therapeutic strategy for management of AH patients.



## **Online METHODS**

### **Patients**

The study used liver samples from patients transplanted for severe AH resistant to medical therapy (AH, n=23) Those patients were selected for liver transplantation at the Liver Unit (Hôpital Huriez, Lille, France) with clinical and analytical features of AH according to selection criteria published in the pilot study (Mathurin et al., 2011). At admission, clinical and analytical features of severe AH included alcohol intake >80 g/day, clinical signs of hepatic decompensation (eg, ascites, encephalopathy), elevated aminotransferases (aspartate aminotransferase (AST) > alanine aminotransferase (ALT)) and serum bilirubin levels without other identifiable cause of liver disease.

In all cases, transjugular liver biopsy was performed to confirm the diagnosis, according to standard of care for AH in France. Histological criteria for AH were based on the presence of the following criteria: hepatocellular damage (presence of Mallory bodies and hepatocellular ballooning), polymorphonuclear infiltrate and steatosis associated with fibrosis.

In most cases, patients were treated with a 7-day course of prednisolone if the Maddrey discriminant function was >32, which defines severe AH, and non-response to medical therapy was defined by a Lille model >0.45 that leads to the corticosteroid withdrawal.

As diseased controls, patients included in the cirrhosis group were transplanted for alcoholic decompensated cirrhosis with profound liver insufficiency despite a prolonged period of abstinence (Cirrh, n=20). None of these patients had histological criteria for AH on the explanted liver. As healthy controls, fragments of normal liver tissues were obtained from patients who underwent liver resection for hepatic tumors (Ctrl, n=20). Examination of non-tumoral parenchyma confirmed the absence of significant liver lesions.

Liver from AH, cirrhotic and control patients have been harvested after comparable time of ischaemia to limit potential bias of variability related to tissue collection during surgical

procedure. Liver samples were immediately fixed or frozen. Demographic and clinical are available in Suppl Table 1.

### ***Animals***

C57BL/6J wild-type mice were obtained from Janvier Labs (France). Animals were kept in a controlled environment (12 h light/dark cycles) and fed a standard rodent pellet diet (RM1, Special Diet Service, France) ad libitum. Experiments performed on animals were approved by the local ethics committee (01757.01) in accredited facilities (B59-35010) according to government guidelines (2010/63/UE).

### ***Liver regeneration induced after carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) intoxication***

Forty C57BL/6J male mice (7-week old) were used for this experiment. Twenty mice were injected with the AAV2/8-YAPS127A and 20 mice were injected with the irrelevant AAV.

Three weeks after AAV2/8-YAPS127A administration, acute liver injury was induced by a single intraperitoneal injection of CCl<sub>4</sub> (12.5 mg/ml in olive oil).

To follow the kinetic of liver regeneration, mice were sacrificed at 24hrs or 48hrs after CCl<sub>4</sub> injection. Liver samples were collected for analysis at each time point. Mice were randomized in four groups of 10 mice. Liver samples were fixed in paraformaldehyde 4% (w/v in PBS, PFA) and paraffin embedded or snap frozen.

### ***Chronic exposure to alcohol***

Eight-week old female mice were used. Mice were i.v. injected with AAV2/8-YAPS127A or with irrelevant AAV. Two weeks later, mice were fed with a liquid diet adapted from Lieber-DeCarli for 17 days, as described by (Louvet et al., 2011). Briefly, the ethanol diet (LDC) was obtained by adding absolute ethanol to a solution of casein, oils (e.g., safflower, corn, and olive oils), and powders (e.g., maltodextrin, vitamins, xanthan gum, choline bitartrate, mineral mix, methionine, and cellulose) in distilled water. The final concentration of ethanol in this

liquid diet is 6.3% (vol/vol), and ethanol accounts for 28% of total caloric intake. The control diet (CD) was obtained by replacing the ethanol by an equivalent quantity of maltodextrin.

Body weight and food intake were measured daily during the whole experiment.

Mice were randomized in 4 groups: 8 mice fed with CD and injected with irrelevant AAV (CD), 5 mice fed with LDC and injected with irrelevant AAV (LDC), 15 mice fed with CD and injected with AAV2/8-YAPS127A (YAPS127A-CD), and 20 mice fed with LDC and injected with AAV2/8-YAPS127A (YAPS127A-LDC). The liver was removed, weighed, and either fixed in PFA or snap-frozen in liquid nitrogen. All samples were stored at -80°C until use.

### ***mRNA isolation and RT-qPCR***

Total RNA was extracted from isolated hepatocytes or liver samples using Nucleospin®RNAII according the manufacturer protocol (Macherey-Nagel EURL, Hoerd, France). First strand cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Real-time PCR was performed using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in StepOne plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Mouse glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) and human TATA-binding protein (TBP) was used as housekeeping genes. Sequence specific PCR primers were designated using Primer3 Software; (Suppl Table 3 and 4 for details).

### ***Immunohistochemistry and immunofluorescence***

Liver samples were fixed with paraformaldehyde 4% and then embedded in paraffin. Four-micrometer-thick sections were exposed to primary antibodies after a specific step of antigen retrieval (Suppl Table 2 for details). After washing in Tris-buffered saline +0.05% Tween 20, sections were incubated for 30 min with EnVision+System-HRP Labelled Polymer (Dako Laboratories, Trappes, France) or with the EnVision G/2 system/AP Kit for alkaline

phosphatase staining. Negative controls were incubated with irrelevant serum or isotype-matched immunoglobulin instead of the specific antibody. Stained slides were observed and analyzed by two expert pathologists under a microscope (Leica, Bensheim, Germany).

### ***Western Blot***

Proteins were extracted from liver samples in a lysis buffer including PBS with 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 100mM Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) and a classical protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) as well as phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich, Lyon, France). One hundred micrograms of total proteins were then separated by SDS-PAGE and electroblotted on nitrocellulose membranes.

Membranes were incubated overnight with primary antibodies (Suppl Table 2). Immunodetection was completed with a secondary peroxidase-conjugated antibody (1:1000, Dako Laboratories, Trappes, France) and chemiluminescence was performed according to the manufacturer's protocol (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France).  $\beta$ -actin was used as a loading control. Band intensity was analyzed using the MM4000 Pro (CareStream, Noisy-le-Grand, France), quantified using Image J (NIH) and compared to  $\beta$ -actin. Results were expressed as relative units.

### ***HepaRG cell culture and treatment***

HepaRG have the capacity to differentiate either in hepatocytes or cholangiocytes. Cells ( $2.7 \times 10^4$  /cm<sup>2</sup>) were maintained in William's E medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 5 mg/mL insulin and  $5 \times 10^{-5}$  M hydrocortisone hemisuccinate.

Upon confluence cells were treated with dobutamine hydrochloride (20 $\mu$ M, Sigma Aldrich) for 30 days in reduced William's medium supplemented with 1% fetal bovine serum, 100 U /

mL penicillin, 100 mg streptomycin, 1 mg / mL insulin and 10<sup>-5</sup>M hydrocortisone hemisuccinate.

### ***Primary human hepatocyte culture and transfection***

The freshly isolated hepatocytes were obtained by Biopredic International (St Gregoire, France). Transfection of the expression plasmid YAPS127A (addgene #27370) was performed by nucleofection using the 4D-Nucleofector™ X Unit (Lonza) according to the protocol recommended by the supplier.

In brief, the hepatocytes were transfected at a rate of  $5 \times 10^5$  cells / nucleocuvette with 5 µg of plasmid YAPS127A. The cells are then pelleted and cultured at a rate of  $1.8 \times 10^6$  hepatocytes / well in a six-well plate coated with collagen in William's E medium supplemented with 100 U / ml penicillin, 100 µg / ml streptomycin, 4 µg / ml of bovine insulin and 50 µM hydrocortisone hemisuccinate. The hepatocytes were then maintained for seven days before harvesting.

### ***AH hepatocyte isolation and culture***

Hepatocyte isolation was achieved using a dedicated perfusion Kit provided by Biopredic.

The parenchymal fraction was isolated by a two-step EDTA/collagenase solution. After perfusion, the liver is dilacerated and filtered on 40 µm membrane. The cell suspension was centrifuged three times at 210g / 2min / +4 ° c. The pellet represents the parenchymal fraction containing the hepatocytes and is harvested with the seeding medium (Biopredic, Rennes, France). Viability is evaluated in a Thoma counting chamber using trypan blue. The hepatocytes are then cultured in six-well plates coated with collagen (Dutsher ref 354400) at 37 ° C, 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator.

### ***Laser capture microdissection***

Frozen liver sections from AH (n = 7), Cirrh (n = 7) and Ctrl (n = 5) patients were used for laser capture microdissection (LCM) of hepatocytes. For each patient, two consecutive

sections of 8  $\mu\text{m}$  were performed. The first section was used to perform YAP staining to guide microdissection. The second section were mounted on RNase-free Glass foiled PEN slides (Leica, Wetzlar, Germany) (No. 11505158, 2.0 mm) and LCM was performed using the ArcturusXT microdissection instrument (MDS). The excised areas were collected on CapSure Macro LCM Caps (Plastic Carriers) (Excilone LCM0211). Total RNA isolation was achieved using the PicoPure RNA Extraction Kit (Excilone 0204, MDS Analytical Technologies) according to the manufacturer instructions. RNA quality was checked with RNA Pico Chips (Agilent Technologies, Massy, France) and a bioanalyzer (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies).

### ***Preparation and RNA-Seq analysis***

Complementary DNA were generated and linearly amplified from 5 ng of total RNA using the Ovation RNA-seq system V2 (NuGEN technologies Inc., Leek, Netherlands), according to manufacturer's instructions. Amplified cDNA was then purified using Agencourt AMPure XP beads (Beckman-Coulter, Villepinte, France) in a 1.8:1 ratio of beads to sample and fragmented by sonication using a Covaris E220 instrument (with duty factor: 10 percent, peak incident power: 175 watts and cycles/burst: 200 for 120 seconds). RNA-Seq libraries were generated from 100 ng of fragmented ds-cDNA using Ovation Ultralow Library System v2 (NuGEN technologies Inc., Leek, Netherlands) according to manufacturer's instructions with only 6 PCR cycles for library amplification. The final libraries were checked for quality and quantified using capillary electrophoresis and sequenced using the Illumina HiSeq4000 as single-end 50 base reads following Illumina's instructions.

### ***RNA-seq data analyses***

Adapters, polyA and low-quality sequences (Phred quality score below 20) were removed and reads shorter than 40 bases were discarded for further analysis using cutadapt version 1.10 (Martin marcel, 2011). Reads were then mapped onto the hg38 assembly of the Homo sapiens

genome using STAR version 2.5.3a (Dobin et al., 2013). Gene expression quantification was performed from uniquely aligned reads using htseq-count version 0.6.1p1 (Anders et al., 2015), with annotations from Ensembl version 96 and “union” mode2. Obtained read counts were normalized across samples with the median-of-ratios method proposed by Anders and Huber (Anders and Huber, 2010). Differentially expressed genes were called using DESeq2 version 1.16.1 (Love et al., 2014). Genes with no p-value were filtered out as this stems from a large value of Cook’s distance, which is intended to indicate an outlier count. P-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method (Benjamini and Hochberg, 1995). Genes with very low counts in all samples were removed from the list of differentially expressed genes. Principal Component Analysis was computed on regularized logarithm transformed data calculated with the method proposed in (Love et al., 2014).

Raw counts from single-cell transcriptomic data (447 cells from E10.5 to E17.5) were processed as in (Yang et al., 2017). This involved data normalization by estimation of library size factor with DESeq 1.26.0 (Anders and Huber, 2010) according to (Brennecke et al., 2013) and technical noise removal thanks to spike-in data (Smyth, G. K., 1998). Finally, highly expressed genes (7288) were identified (Gentleman et al., 2019) and used for PCA performed using FactoMineR 1.41 (Lê S, Josse J, Husson F, 2008). Finally, the average expression in each cell of genes previously identified as being significantly higher in AH or Cirrh was displayed on 2D PCA plot.

### ***Gene set enrichment analyses (GSEA)***

Analyses were performed using the GSEA software (v3.0) from the Broad Institute (Subramanian et al., 2005). We used 1000 gene-set permutations and the following settings: “weighted” as the enrichment statistic and “Signal2Noise” as the metric for ranking genes. We used the normalized RNA-seq gene expression data and gene sets provided. In addition to enrichment plots, figures also provide NES and FDR, which are the normalized enrichment

score and the false discovery rate provided by the GSEA software, respectively. In experiments with multiple conditions, the BubbleGUM tool (GSEA Unlimited Map v1.3.19) (Spinelli et al., 2015) was used to integrate and compare numerous GSEA results with multiple testing correction.

### *Statistics*

Data were expressed as mean $\pm$ SD or medians. All comparisons were analysed using the Mann–Whitney test. Statistics were calculated using GraphPad Prism V.5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Differences were considered as statistically significant if the p value was  $<0.05$ .



## Figure legends

**Figure 1: Abnormal YAP activation in liver of AH patients.** (a) Heatmap showing YAP actors expression from liver AH explants (blue), biopsy from severe AH (green), biopsy from early AH patients (red) and normal liver from control patients (black). (b) Real-time PCR performed on liver samples from control patients (Ctrl), patients with alcoholic hepatitis (AH) and alcoholic cirrhosis (Cirrh). mRNA expression of YAP its target genes, NUA2, ANKRD1, TGF $\beta$ 2, and its cofactor TEAD4 were compared to the housekeeping gene TBP. (c) Representative western blot of liver content of active and inactive MST1.  $\beta$ -actin used as loading control. The dot-plots illustrate band intensity quantification for the total MST1 and the active MST1. Results are expressed as the ratio of total MST1/ $\beta$ -actin, and active MST1/ $\beta$ -actin in RUs. (d) Representative YAP Immunostainings in liver from control (Ctrl), alcoholic hepatitis (AH) and cirrhosis (Cirrh) with x100 magnification (upper panel) or with x200 magnification (lower panel). Portal bile ducts are stained in Ctrl livers (arrowheads, left panel). In cirrhotic liver (Cirrh), we observe intense staining in the fibrotic string around regenerative nodules. AH liver displays massive staining, which invades the entire parenchyma.

Statistical significances are indicated.

**Figure 2: YAP is expressed in the nucleus of hepatocytes of AH patients and is associated with hepatocyte expression of biliary marker.** (a) Co-immunostaining of YAP (green) and the hepatocyte marker, albumin (red), in liver of control patients (Ctrl), patients with alcoholic hepatitis (AH) or alcoholic cirrhosis (Cirrh) (magnification  $\times$ 100). (b) Representative Immunostainings for SOX9 and HNF1 $\beta$  in livers from control (Ctrl), alcoholic hepatitis (AH) and cirrhosis (Cirrh) (magnification  $\times$ 200). Portal bile ducts are stained in Ctrl livers. In cirrhotic liver, we observe intense staining in the fibrotic string around regenerative nodules. AH liver displays massive staining, which invades the hepatocytes in entire

parenchyma (arrow heads). (c) Real-time PCR showing the decrease of the mRNA expression of hepatocytes markers CYP3A4, TAT, Albumin and Aldolase B in the liver of AH, compared to the cirrhosis (Cirrh) and controls (Ctrl).

**Figure 3: Hepatic to cholangiocytic changes in cell identity revealed by transcriptomic analyses.**

a) Principal component analysis performed on normalized gene expression data from microdissected hepatocytes from AH, Cirrh and Ctrl patients. b) All pairwise comparisons were performed and the number of differentially expressed genes ( $\text{Log}_2$  fold change  $> 1$ ; FDR  $< 0.05$ ) was used to prepare the heatmap. c) Enrichment plots from GSEA performed using genes related to the Hippo/YAP or Notch pathways as indicated and transcriptomic differences between AH and Cirrh. d) Similar analyses as in c using gene sets defining the hepatocyte (Hep-ID) or cholangiocyte (Chol-ID) identities as indicated. e) Average expression of genes identified as significantly higher in Cirrh or AH in single-cells from the hepatobiliary lineage. See Materials and Methods together with (Suppl Fig.3b) for details regarding data processing. The hepatoblast-to-hepatocyte and hepatoblast-to-cholangiocyte differentiation paths are indicated.

**Figure 4: Yap modulation in human primary hepatocytes and in bipotent HepaRG cells affects the hepatocyte phenotype.**

(a) Schematic illustration of transfection protocol by nucleofection of YAPS127A expression vector in human primary hepatocyte. (b) After a 7-day culture period mRNA expression of YAP, its target genes (ANKRD1, NUA2, TGF $\beta$ 2, NOTCH2 and JAG1), hepatocyte (CYP3A4, Aldolase B, TAT and Albumin) and biliary markers (CK7 and CK19) was evaluated in mock-transfected hepatocytes (white bars) or YAPS127A-transfected hepatocytes (black bars). Results are expressed as relative unit (mean  $\pm$  SEM) and statistical significance indicated. (c) Green immunofluorescent staining of YAP in undifferentiated (HepaRG D0) and differentiated (HepaRG D30) HepaRG cells. Red

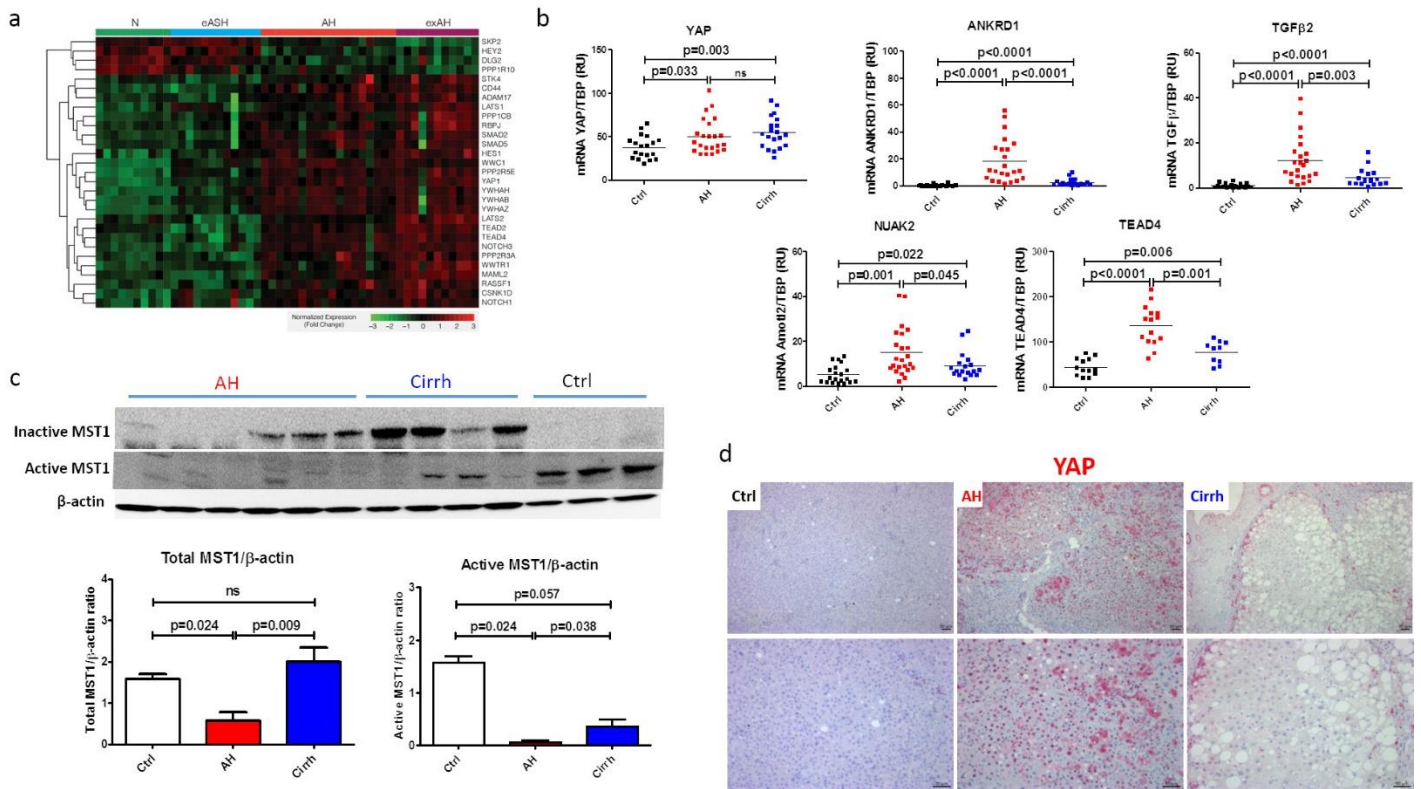
arrowheads pointed out the absence of nuclear YAP staining in hepatocyte-like cells (H). Biliary-type cell (CH) displayed an important nuclear YAP staining. (d) Representative picture of HepaRG cells phenotype after 30-day differentiation period of cell treated with the vehicle (HepaRG + Vehicle) or the YAP inhibitor, dobutamine (HepaRG + dobutamine). (e) Histogram representing mRNA expression of YAP, its target genes (ANKRD1, NUA2, TGF $\beta$ 2, NOTCH2 and JAG1), hepatocyte (CYP3A4, Aldolase B, TAT and Albumin) and biliary markers (CK7 and CK19). Results are expressed as relative unit (mean  $\pm$  SEM) and statistical significance indicated.

**Figure 5: In vivo activation of YAP in hepatocyte led to hepatocytes dedifferentiation upon alcohol exposure, and blocked hepatocyte proliferation after CCl<sub>4</sub>-induced injury.**

(a) Diagram representing the ratio between the liver weight and the body weight in mice fed with control diet and injected with irrelevant AAV (CD), mice fed with Lieber DeCarli diet and injected with irrelevant AAV (LDC), mice fed with control diet and injected with AAV2/8-YAPS127A (YAPS127A-CD), and mice fed with Lieber DeCarli diet and injected with AAV2/8-YAPS127A (YAPS127A-LDC) (b) Representative YAP and SOX9 immunostainings (magnification x200). (c) Histogram representing Hnf1 $\beta$  mRNA expression in liver of the 4 group of mice. Results are expressed as relative unit (mean  $\pm$  SEM) and statistical significance indicated. (d) Immunostainings evaluating BrdU incorporation 48hrs after CCl<sub>4</sub> intoxication in mice receiving CCl<sub>4</sub> and injected with irrelevant AAV (CCl<sub>4</sub>) and in mice receiving CCl<sub>4</sub> and injected with AAV2/8-YAPS127A (CCl<sub>4</sub> + YAPS127A). (e) Histogram representing BrdU-positive cell counting 48hrs after CCl<sub>4</sub> injection in the 2 groups of mice. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of BrdU positive hepatocytes per mm<sup>2</sup>. (f) Histogram representing Hnf1 $\beta$  mRNA expression in liver of the 2 group of mice. Results are expressed as relative unit (mean  $\pm$  SD) and statistical significance indicated.

**Figure 6: Dobutamine treatment of primary AH hepatocytes induced a decrease in YAP activity and of biliary marker expression.** (A) Schematic illustration of isolation and culture of primary hepatocytes from AH liver treated with dobutamine for 24hrs. (B) Histogram representing mRNA expression of YAP, its target genes (ANKRD1, NUA2, and TGF $\beta$ 2), hepatocyte (CYP3A4, Aldolase B, TAT and Albumin) and biliary markers (HNF1 $\beta$ , SOX9, CK7 and CK19). Results are expressed as relative unit (mean  $\pm$  SD) and statistical significance are indicated.

**Figure 1**



**Figure 2**

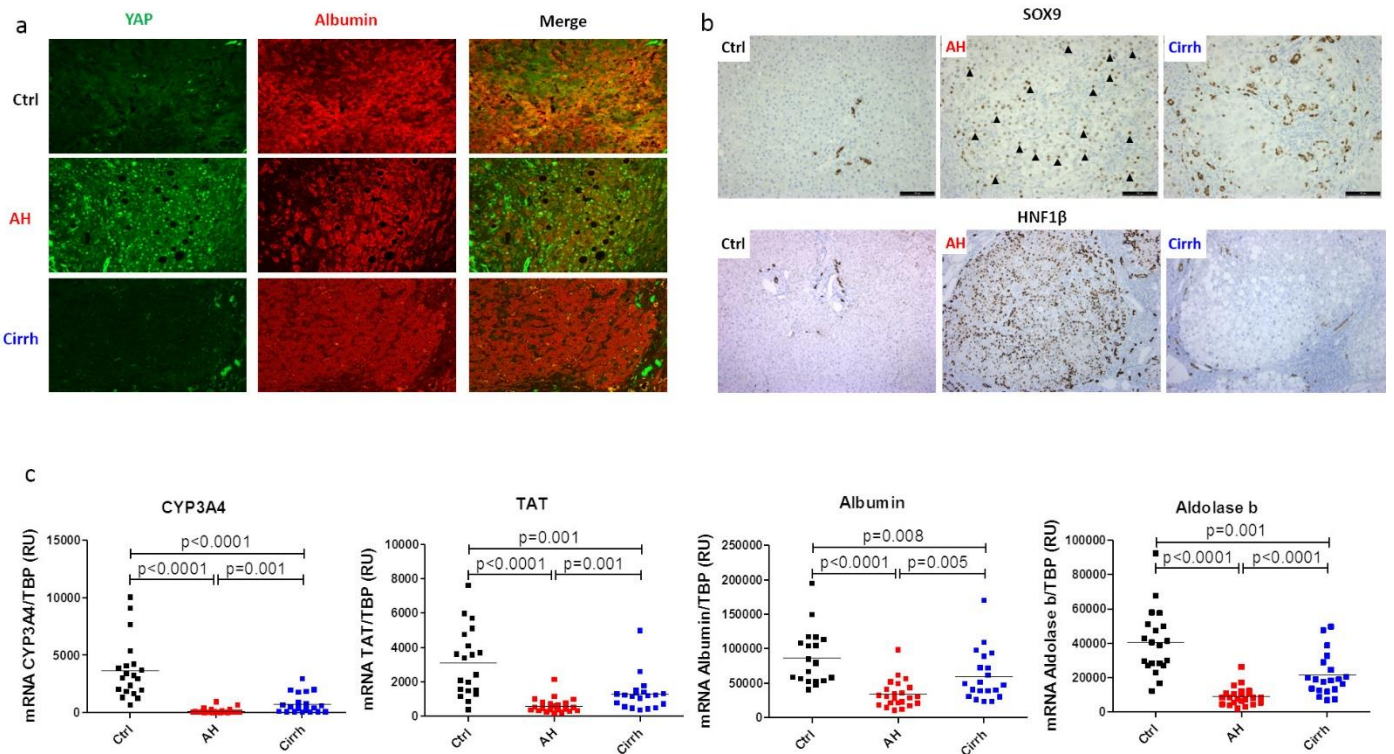


Figure 3

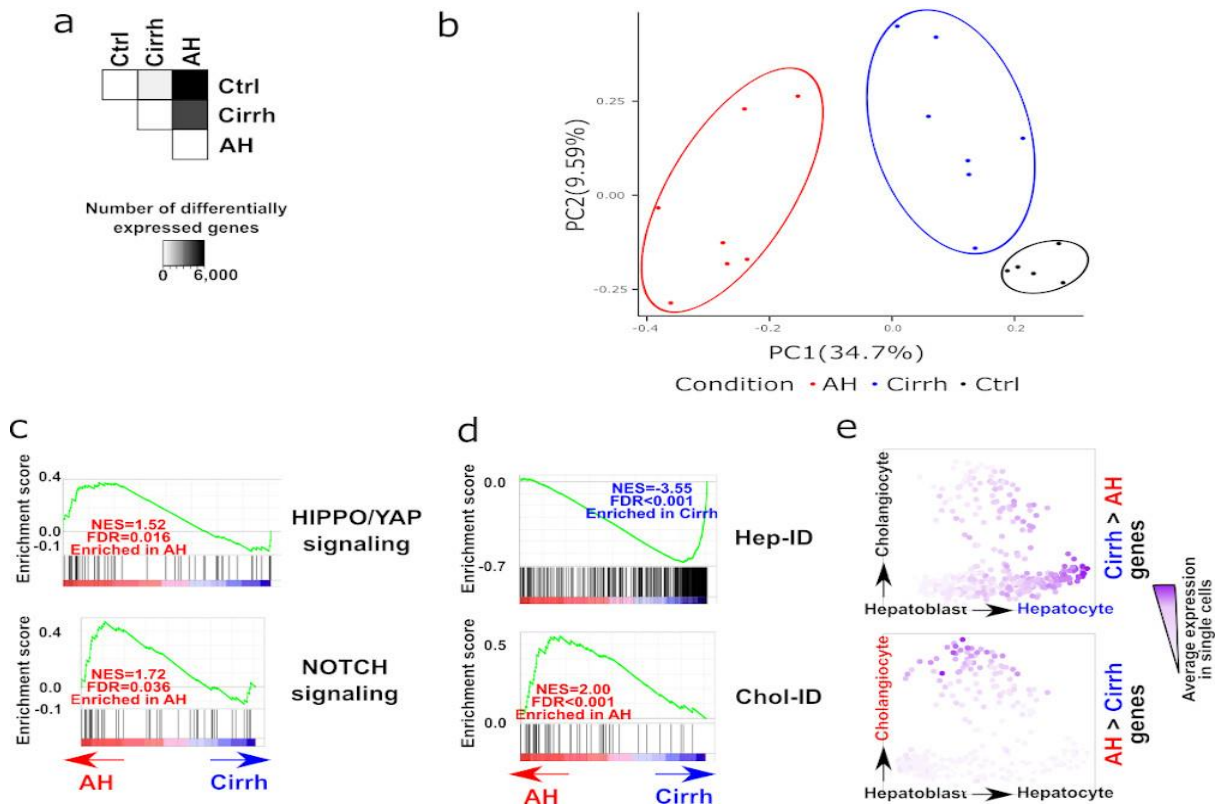
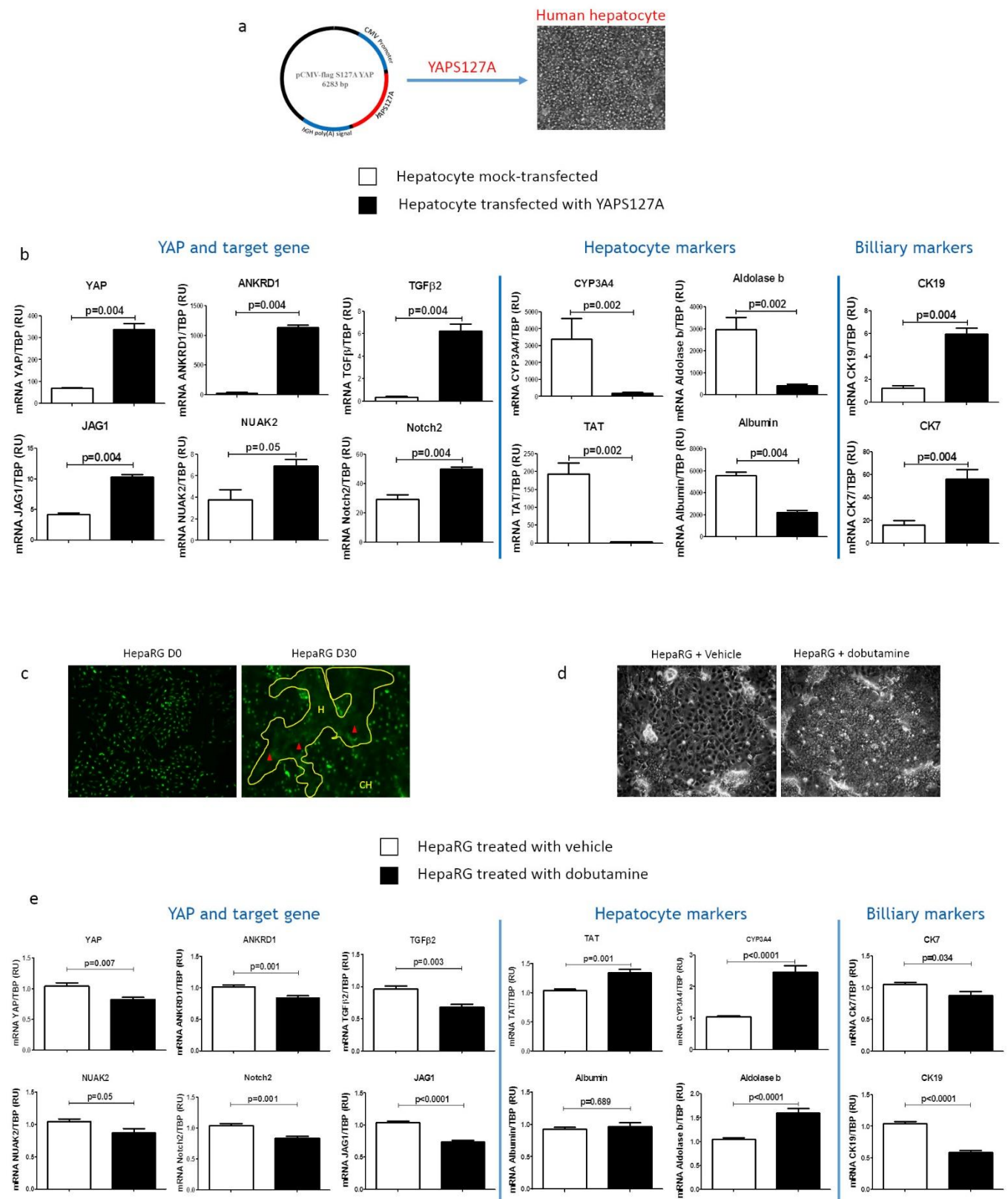
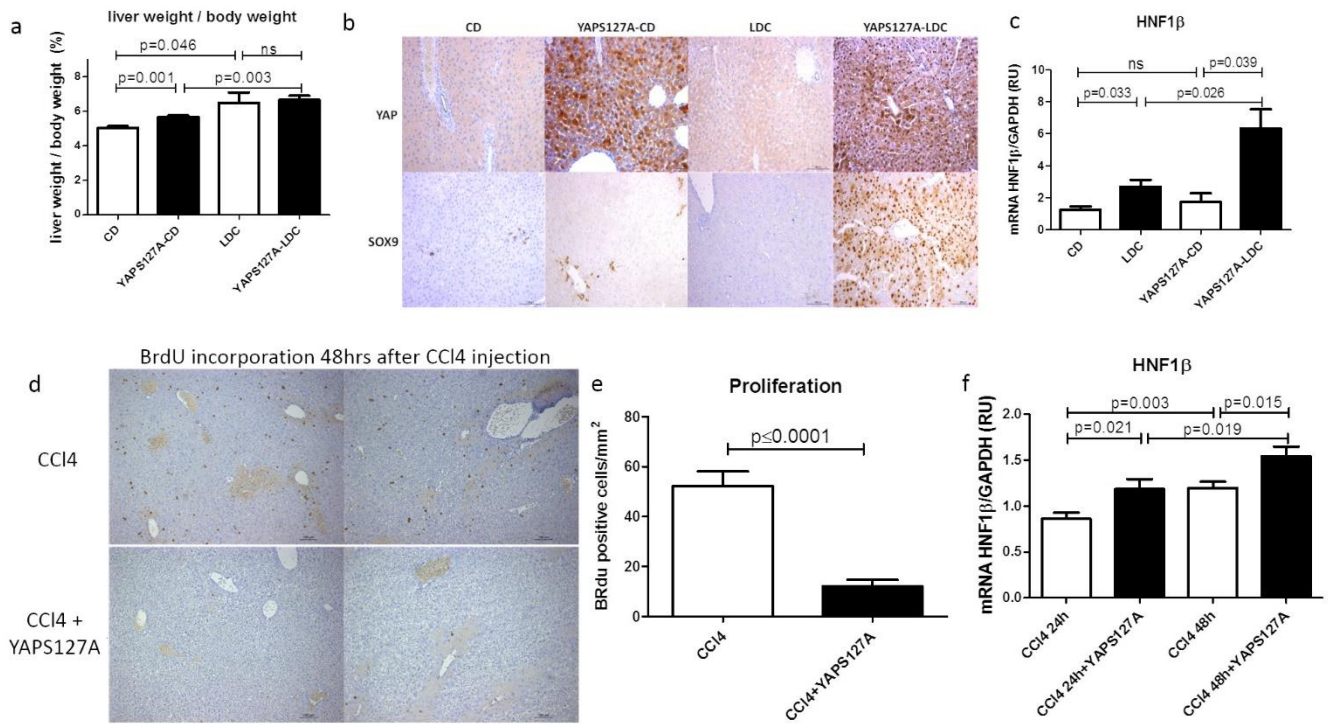


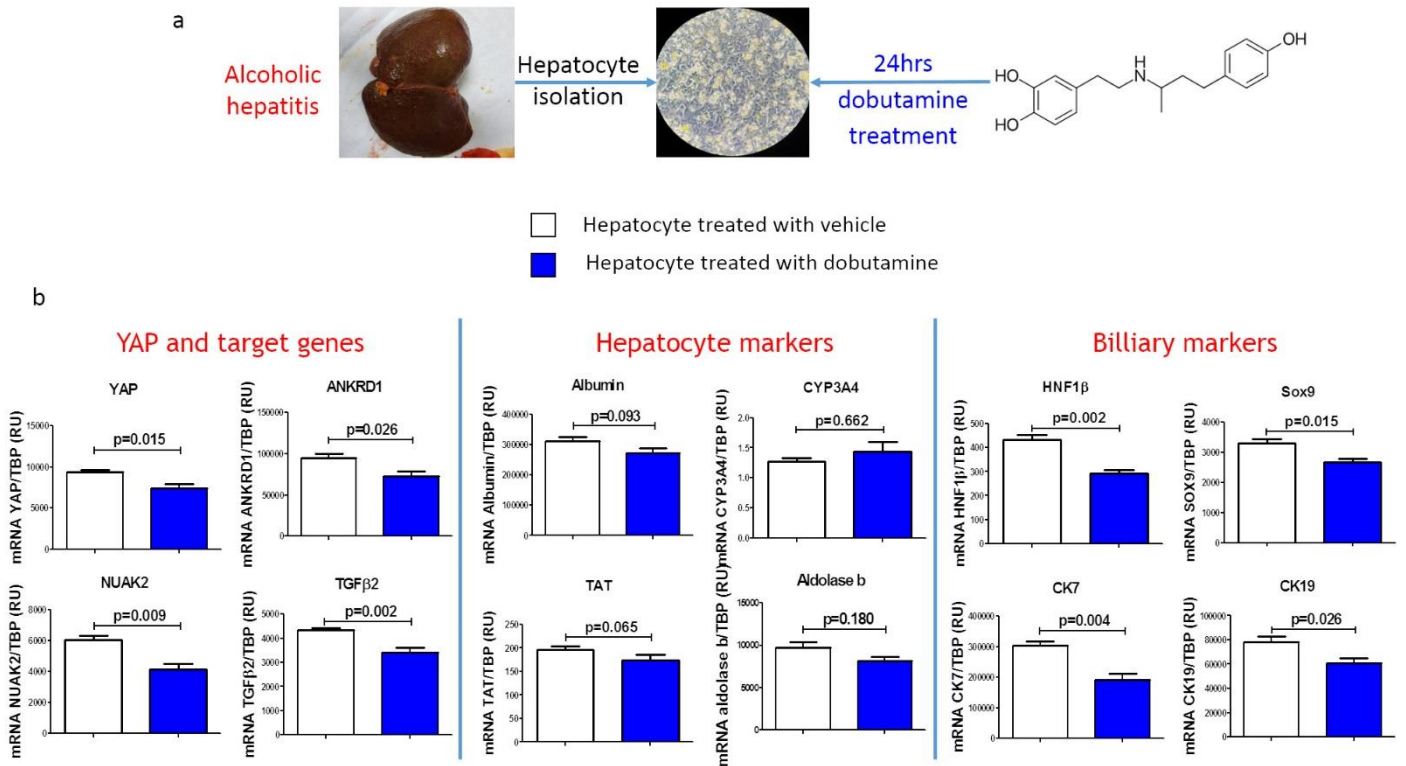
Figure 4



**Figure 5**



**Figure 6**





## Supplementary data

**Supplementary Figure 1: Notch actor expression in liver of patients.** a) Representative immunostaining for Notch1 and Notch2 in livers from control (Ctrl), alcoholic hepatitis (AH) and cirrhosis (Cirrh). Original magnification of the upper panel x100. The black dotted drawn box present in x100 image represents the area enlarged in x200 image. b) The dot-plot represents NOCTH1, NOTCH2, and JAG1 mRNA expression in livers from control (Ctrl), alcoholic hepatitis (AH) and cirrhosis (Cirrh). Results are expressed as relative units (RUs) of mRNA compared to the housekeeping gene (TBP) mRNA. Each patient is represented and the median is indicated as a solid line. Statistical significances are indicated.

**Supplementary Figure 2: No difference in the expression of YAP and dedifferentiation markers between responder and non-responder patients.** Immunostaining of YAP, SOX9 and HNF1beta in biopsy of patients with are responder to corticosteroid treatments (R) and in liver biopsy from non-responders (NR) at D0 of hospitalization. (original magnification x100).

## **Supplementary Figure 3: Complementary transcriptomic data analyses**

a) Enrichment scores from GSEA performed using the indicated gene sets (similar to Fig.3) and transcriptomic differences issued from the comparison indicated on the left were integrated and corrected for multiple testing using the BubbleGUM tool. b) Principal component analysis (PCA) plot issued from the analysis of 447 hepatobiliary single-cell transcriptomes across seven developmental stages which are color-coded. Refer to Materials and Methods for a detailed description of the procedure. The hepatoblast-to-hepatocyte and hepatoblast-to-cholangiocyte differentiation paths are indicated with arrows.

**Supplementary Figure 4: AAV2/8-YAPS127A transduction efficiency in-vivo.** a) Analysis of the human YAP mRNA expression validates the functionality of the

AAVYAPS127A transduction in the YAPS127A-CD and YAPS127A-LDC mice compared to the CD and LDC group mice. The analysis of mouse YAP mRNA expression shows no difference between the groups. b) Diagram representing the ratio between the liver weight and the body weight in mice treated with CCl<sub>4</sub> to 24h or 48h and injected with irrelevant AAV (CCl<sub>4</sub>), mice treated with CCl<sub>4</sub> to 24h or 48h and injected with AAV2/8-YAPS127A (CCl<sub>4</sub>+YAPS127A). Histogram YAP human and YAP mice mRNA expression in liver of the 4 group of mice. Results are expressed as relative unit (mean  $\pm$  SEM) and statistical significance indicated.

**Supplementary Figure 5: Laser microdissection process and quality control of mRNA.** a) Figure that illustrates IHC staining of YAP on frozen liver sections of Ctrl, AH and Cirrh. The first section stained with YAP is used to identify areas of interest. A second successive section is used for laser microdissection of areas of interest identify on the first section. The recovered area obtained after microdissection adhere to a capsule. b) Percentage of different and unique reads in each sample. These percentages were calculated relative to the number of reads after preprocessing step.

**Supplementary Table 2:** Primary antibodies used for Western-Blot (WB) or immunohistochemistry (IHC) or immunofluorescence (IF).

Target	Application	Clone	Dilution	Fournisseur	Reference	Note
$\beta$ -actin	WB	Mouse mAb [AC-15]	1:10.000	Sigma	A5441	
MST1	WB	MST1 (D8B9Q)	1:1000	cell signaling	#14946	
Notch1	IHC	Notch1 (D1E11) XP®	1:400	cell signaling	#3608	
Notch2	IHC	Notch2 (D76A6) XP®	1:200	cell signaling	#5732	
YAP	IHC (Frozen)	YAP (D8H1X) XP®	1:100	cell signaling	#14074	
YAP	IHC (paraffine)	YAP (D8H1X) XP®	1:400	cell signaling	#14074	
HNF1 $\beta$	IHC	Mouse mAb CL0374	1:200	Sigma	AMAB90733	
Sox9	IHC	Clone EP317	1:100	Diagomics	BSB3216	
YAP	IF	YAP (D8H1X) XP®	1:100	cell signaling	#14074	Tyramide amplification
Albumin	IF	goat polyclonal	1:50	Bethyl laboratory	A80-229A	

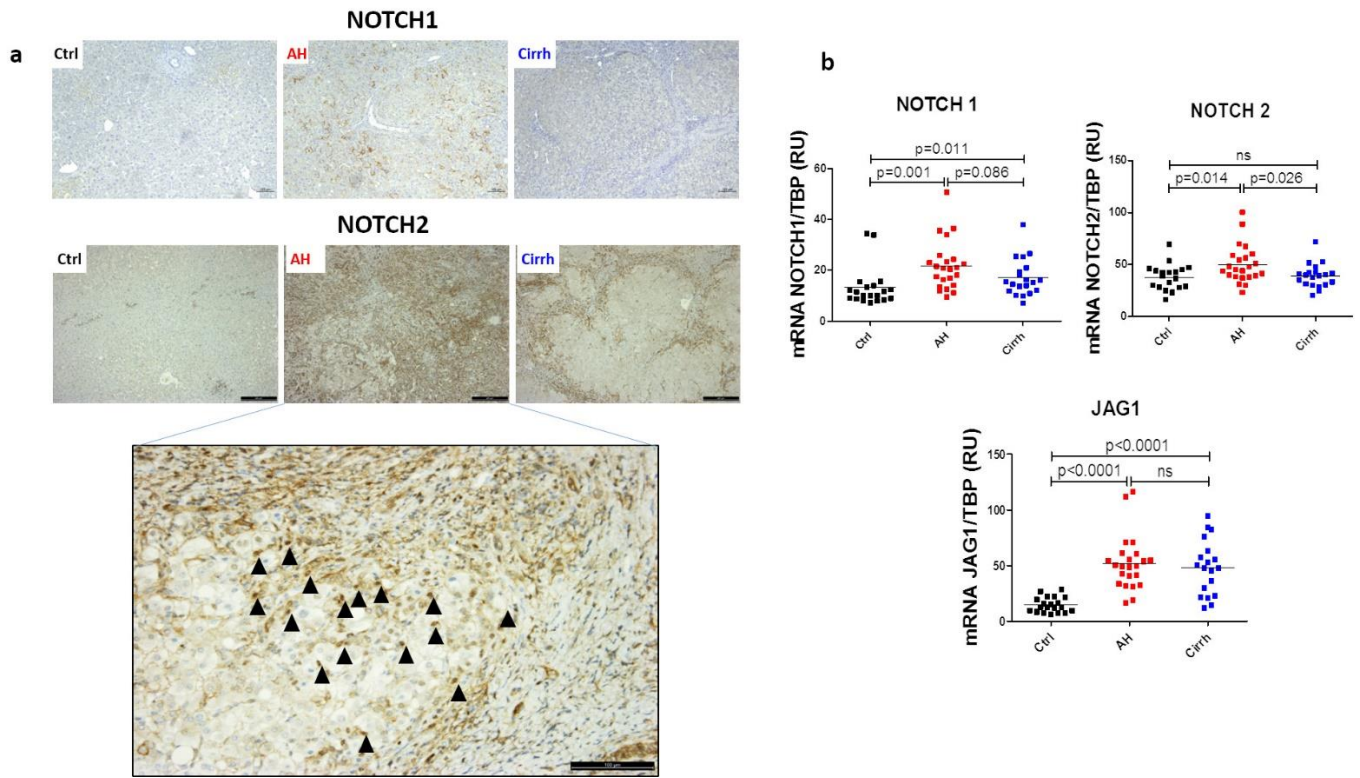
**Supplementary Table 3:** Human primer sequences used for Real-Time PCR

TBP	Forward	TGA-GAA-GAT-GGA-TGT-TGA-GTT-G
	Reverse	AGA-TAG-CAG-CAC-GGT-ATG-AG
NOTCH1	Forward	GGT-GAG-ACC-TGC-CTG-AAT-G
	Reverse	GTT-CTT-GCA-GGG-GGT-GC
NOTCH2	Forward	TGT-GAC-ATA-GCA-GCC-TCC-AG
	Reverse	CAG-GGG-GCA-CTG-ACA-GTA-AT
JAG1	Forward	GAC-TCA-TCA-GCC-GTG-TCT-CA
	Reverse	TGG-GGA-ACA-CTC-ACA-CTC-AA
YAP	Forward	TCA-TGC-TTA-GTC-CAC-TGT-CTG-T
	Reverse	TAG-CCC-TGC-GTA-GCC-AGT-TA
NUAK2	Forward	GAT-GCA-CAT-ACG-GAG-GGA-GATT
	Reverse	ATC-ACG-ATC-TTG-CTG-CTG-TTC-T
ANKRD1	Forward	CGC-CAA-AGA-CAG-AGA-AGG-AG
	Reverse	CGC-CAT-ACA-TAA-TCA-GGA-GTC
TGF $\beta$ 2	Forward	CAC-GAA-CCC-AAA-GGG-TAC-AA
	Reverse	ATA-TAA-GCT-CAG-GAC-CCT-GCT
TEAD4	Forward	TAT-GAG-AGC-CCC-GAG-AAC-AT
	Reverse	AGC-GAG-CAT-ACT-CTG-TCT-CA
CYP3A4	Forward	GCC-TGG-TGC-TCC-TCT-ATC-TA
	Reverse	GGC-TGT-TGA-CCA-TCA-TAA-AAG
TAT	Forward	CAA-TGA-AAG-ATG-CCC-TGG-AC
	Reverse	GCA-GCC-ACT-TGT-CAG-AAT-GA
Albumin	Forward	TGC-TGA-TGA-GTC-AGC-TGA-AAA
	Reverse	TCA-GCC-ATT-TCA-CCA-TAG-GTT
Aldolase b	Forward	GAT-TCA-TCT-GCA-GCC-AGG-AT
	Reverse	AGG-AGG-ACT-CTT-CTC-TCC-CAA
CK19	Forward	TTT-GAG-ACG-GAA-CAG-GCT-CT
	Reverse	CCC-TCA-GCG-TAC-TGA-TTT-CC
CK7	Forward	CAG-GAT-GTG-GTG-GAG-GAC-TT
	Reverse	TGA-GGG-TCC-TGA-GGA-AGT-TG

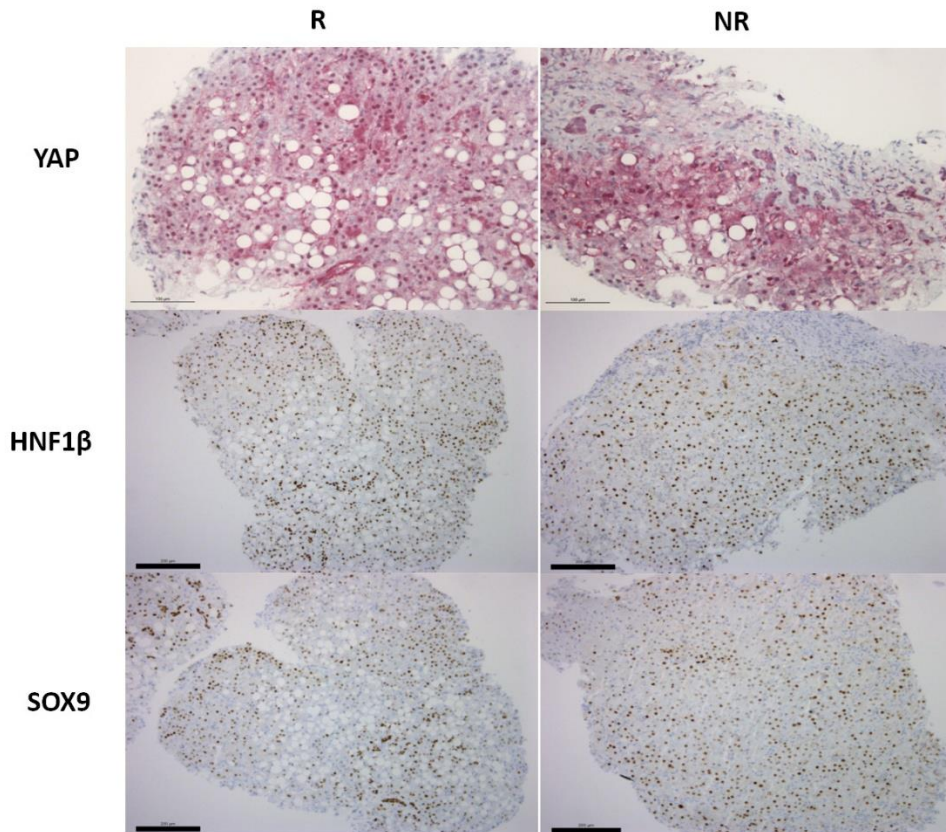
**Supplementary Table 4:** Mouse primer sequences used for Real-Time PCR

GAPDH	Forward	ATG-GGA-AGC-TTG-TCA-TCA-ACG
	Reverse	GGC-AGT-GAT-GGC-ATG-GAC-TG
YAP	Forward	CCA-GCA-GCA-GCA-AAT-ACA-GC
	Reverse	TCC-GTA-TTG-CCT-GCC-GAA-AT
HNF1	Forward	GAT-CAC-AGT-GTC-GGG-AGG-A
	Reverse	GTG-TTG-AGG-CTC-TGT-GCA-AT

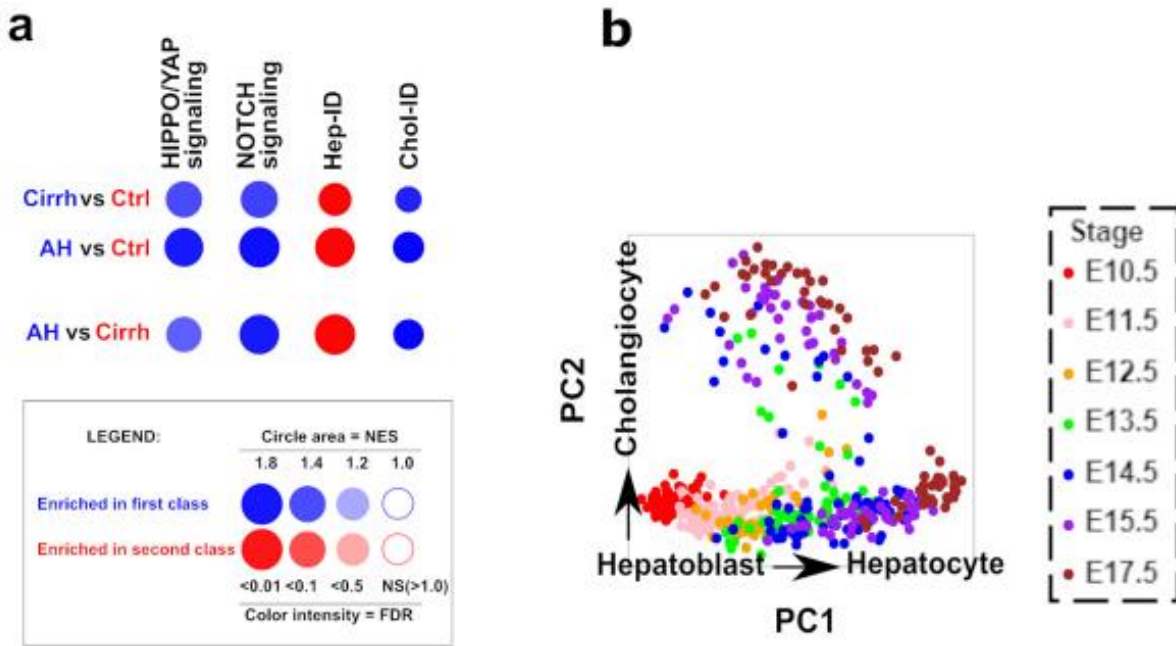
Suppl. Figure 1



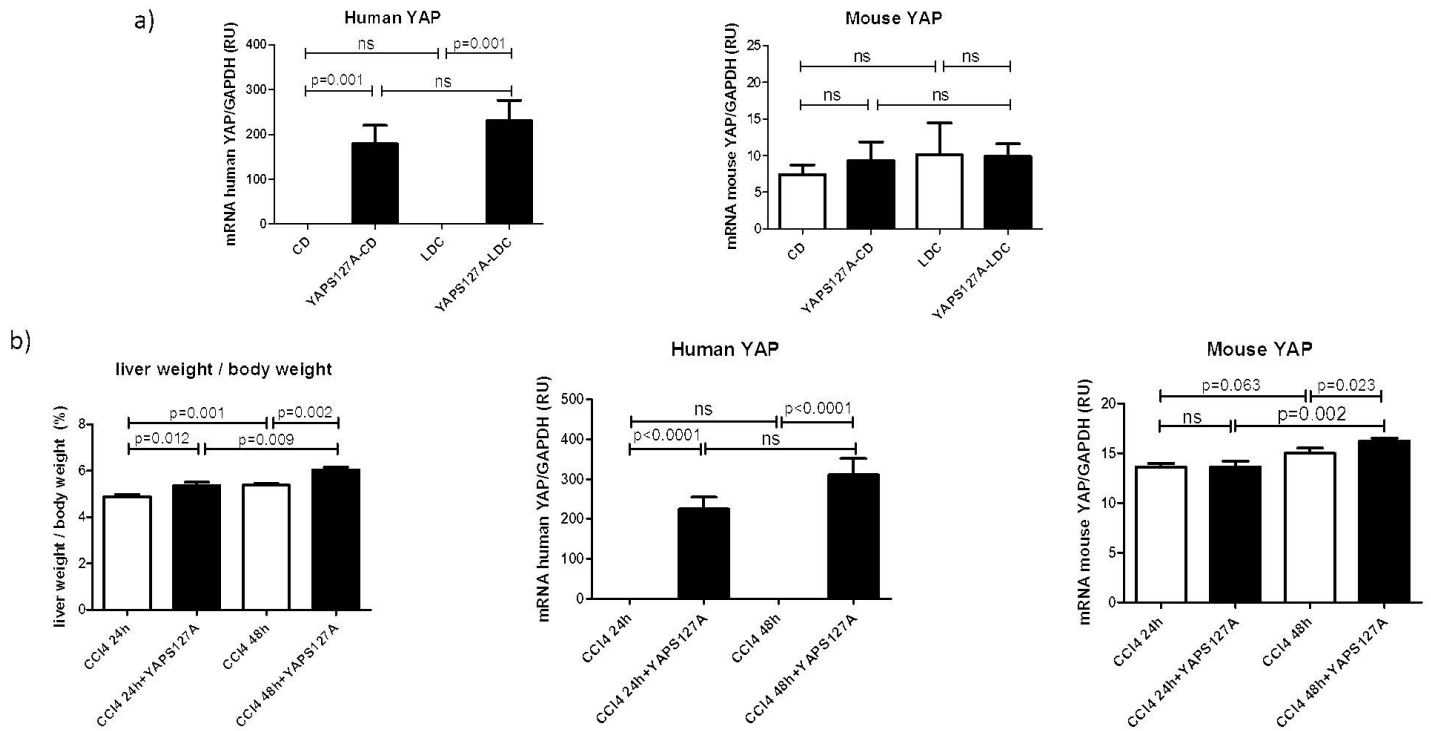
Suppl. Figure 2



Suppl. Figure 3



Suppl. Figure 4



## 2- Nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) modulates liver ischemia reperfusion through the expression adhesion molecules

### 2-1 - Introduction Générale manuscrit 2 :

L'HA est une pathologie caractérisée par un important infiltrat de polynucléaires neutrophiles (PNN) dans le parenchyme hépatique. Même si de nos jours plusieurs études ont essayé de démontrer le rôle physiopathologique des PNN dans l'HA, et de déterminer les causes et conséquences de leur présence dans le parenchyme hépatique, aucun modèle murin d'alcoolisation n'a permis d'étudier en profondeur ce phénomène. Plusieurs hypothèses sont discutées quant à la cause de cet infiltrat massif de PNN dans le parenchyme hépatique. Parmi elles, l'augmentation de la perméabilité intestinale est responsable d'un passage important de LPS et de motifs associés aux pathogènes (PAMPs) vers le foie. Ce passage de composés bactériens va stimuler l'infiltration et l'activation. L'alcool et les composés bactériens vont induire une nécrose hépatocytaire qui à son tour va libérer des chimiokines attirant le PNN.

Dans ce contexte, nous avons évalué les interactions entre le PNN et l'hépatocyte dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion afin d'en comprendre les mécanismes.

Le concept d'ischémie-reperfusion (IR) consiste en l'augmentation du dommage tissulaire induit par une carence temporaire en oxygène lorsque cet apport est restauré. Ce phénomène est rencontré très fréquemment dans les pathologies aiguës, et concerne notamment les défaillances circulatoires (états de choc), l'infarctus du myocarde, l'infarctus cérébral, l'infarctus mésentérique, la transplantation d'organes et le clampage vasculaire au cours de la chirurgie hépatique. Dans toutes ces situations se développe une période plus ou moins prolongée d'ischémie. Bien que le traitement vise à restaurer dès que possible l'apport en oxygène, on sait aujourd'hui qu'une telle restauration engendre en elle-même une série de

phénomènes dommageables, regroupés sous le terme générique de « lésion de reperfusion » caractérisée par un important infiltrat de PNN.

Le foie est un organe particulièrement susceptible aux lésions d'IR et peuvent avoir des conséquences parfois graves en termes de survie de greffon (en cas de transplantation) et du patient. Sur le plan physiopathologique, les lésions hépatiques d'IR sont caractérisées par un important infiltrat à polynucléaires neutrophiles (PNN) dans les zones de nécrose hépatocytaire. Ces neutrophiles migrent dans le foie sous l'effet de facteurs chimioattractants afin d'exercer sur le site de l'agression leurs fonctions de phagocytose et de défense antibactérienne. Dans le cas de l'IR, les neutrophiles vont avoir un effet délétère en étant responsables des lésions hépatiques.

Le foie est un organe régulièrement exposé aux composants bactériens, appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), en relation avec la perméabilité intestinale. Cette dernière est communément augmentée dans de nombreuses situations pathologiques chez l'homme comme chez l'animal, telles que l'exposition à l'alcool et les maladies du foie. Les PAMPs dérivés du tube digestif interagissent avec des récepteurs de reconnaissance des PAMPs (PRRs) exprimés par les cellules hépatiques parenchymateuses et non parenchymateuses. Une famille émergente de PRRs cytoplasmiques appelés nucleotide-binding oligomerization proteins (NOD) a été récemment décrite et comporte 2 membres NOD1 et NOD2. NOD1 reconnaît un motif de la paroi des bactéries à gram négatif. Il semble réguler les mécanismes de défense de l'immunité innée médiés par le polynucléaire neutrophile.

Dans une étude de notre laboratoire, il a été montré que NOD1 était essentiel à la survenue des lésions induites par les PNN au cours de l'IR, notamment en induisant l'expression de molécule d'adhérence (tel que CD11b) à la surface des PNN (Dharancy et al., 2010). Ce travail suggère que si nous pouvions limiter le passage des composés bactériens du



tube digestif vers le foie via la veine porte, il serait possible de diminuer significativement les lésions d'IR et ainsi d'améliorer le traitement et la survie des patients subissant une intervention chirurgicale au niveau du foie.

Dans ce travail, nous avons mis au point une étude visant à élucider le rôle de NOD1 au niveau de l'hépatocyte et des cellules endothéliales dans un modèle murin d'IR NOD1 KO ou en utilisant des nanoparticules contenant un antagoniste de NOD1.

Nos travaux ont démontré que le traitement par agoniste NOD1 augmentait les lésions hépatiques, l'infiltration du tissu par les PNN et l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et de VCAM-1, 20 heures après la reperfusion. Le traitement par agoniste NOD1 sans IR augmentait l'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) dans le foie total et plus particulièrement dans les hépatocytes WT, mais pas dans les hépatocytes Nod1 KO. Cette induction dépendait des voies de signalisation des MAPKinases p38 et ERK1/2.

Comparé aux hépatocytes non-traités, un agoniste NOD1 a nettement augmenté la lyse des hépatocytes en co-culture avec les PNN, comme le montre l'augmentation de la lactate déshydrogénase dans les surnageant. L'interaction entre les hépatocytes et les PNN a été confirmée par microscopie électronique. Dans un modèle murin d'IR hépatique, le traitement par np ALINO (nanoparticule contenant un antagoniste de NOD1) a réduit de manière significative la zone de nécrose, les taux d'aminotransférase sériques et l'expression d'ICAM-1.

Cette étude a permis d'identifier les mécanismes, médiés par NOD1, permettant de moduler les lésions d'IR induite par les PNN via l'induction de molécules d'adhésion et la modulation des interactions entre le PNN et l'hépatocyte.

**Nucleotide-binding oligomerization domain 1 modulates liver ischemia  
reperfusion through the expression adhesion molecules.**

Guillaume Lassailly<sup>1,2</sup>, Mohamed Bou Saleh<sup>1</sup>, Natascha Leleu-Chavain<sup>1,3</sup>, Massih Ningarhari<sup>1,2</sup>, Emilie Gantier<sup>1</sup>, Rodolphe Carpentier<sup>1</sup>, Florent Artru<sup>1,2</sup>, Viviane Gnemmi<sup>5</sup>, Benjamin Bertin<sup>1</sup>, Patrice Maboudou<sup>6</sup>, Didier Betbeder<sup>1,4</sup>, Céline Gheeraert<sup>7</sup>, François Maggiotto<sup>1</sup>, Sébastien Dharancy<sup>1,2</sup>, Philippe Mathurin<sup>1,2</sup>, Alexandre Louvet<sup>1,2</sup>, Laurent Dubuquoy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LIRIC – Lille Inflammation Research International Center – U995, Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, F-59000 Lille, France. emilie.gantier@inserm.fr, mohamed.bou-saleh@inserm.fr, rodolphe.carpentier@univ-lille2.fr, benjamin.bertin-2@univ-lille2.fr, franzmagg@gmail.com, laurent.dubuquoy@inserm.fr

<sup>2</sup> Service des Maladies de l'Appareil Digestif et de la Nutrition, CHU Lille, F-59000 Lille, France. guillaume.lassailly@chru-lille.fr, m.ningarhari@gmail.com, florent.artu@chru-lille.fr, sebastien.dharancy@chru-lille.fr, philippe.mathurin@chru-lille.fr, alexandre.louvet@chru-lille.fr

<sup>3</sup> Institut de Chimie Pharmaceutique de Lille, Faculté de Pharmacie, Univ Lille, F-59000 Lille, France. natascha.leleu-2@univ-lille2.fr

<sup>4</sup> Université d'artois, F-62300 Lens, France. betbederdidier985@gmail.com

<sup>5</sup> Service d'anatomopathologie, CHU Lille, F-59000 Lille, France. viviane.gnemmi@chru-lille.fr

<sup>6</sup> UF 8832 - Biochimie Automatisée, Pôle de Biologie Pathologie Génétique, CHRU de Lille, F-59000 Lille, France. patrice.maboudou@chru-lille.fr

<sup>7</sup> U1011 - EGID, Univ. Lille, Inserm, Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France. celine.gheeraert@inserm.fr

**Key words:** Liver ischemia reperfusion; Innate immunity; liver transplantation; adhesion molecules; hepatocytes; nanoparticles antagonist,

**Contact Information :**

Laurent Dubuquoy, Ph. D. LIRIC – UMR995, 4<sup>e</sup> étage Est, Faculté de Médecine - Pôle Recherche, 1 Place Verdun, 59045 Lille Cedex, France. Email: laurent.dubuquoy@inserm.fr; phone : +33 3 20974208, fax: +33 3 20623525 or Guillaume Lassailly, MD. Service des Maladies de l'Appareil Digestif et de la Nutrition, Hôpital Huriez, CHU Lille, rue Michel Polonovski, 59045 Lille Cedex, France. Email: guillaume.lassailly@chru-lille.fr; phone: +33 3 20445321, fax: +33 3 20444713

**Electronic word count:** 7288 (manuscript, figures legend, reference)

**List of abbreviations:** danger-associated molecular patterns (DAMPs), electron microscopy (EM), extracellular signal-regulated kinase (ERK), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ischemia/reperfusion (IR), lactate dehydrogenase (LDH), liver sinusoidal endothelial cells (LSEC), mitogen-activated protein (MAP), nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1), nanoparticle (np), pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), phosphate buffer saline (PBS), paraformaldehyde (PFA), Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF), polymorphonuclear neutrophil (PMN), pattern recognition receptors (PRR), Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), relative units (RU), sodium dodecyl sulphate (SDS), Secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP), poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), wild-type (WT).

**Disclosure:** The authors declare no conflict of interest in relation to this manuscript.

**Financial support:** The author acknowledges funding support from the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism grant 1U01AA021908, AFEF, program StartAIRR ANOD1 Region Haut de France.

**Ethics committee number for animal experiments:** n° 01757.01

**Author contributions**

E.G., M.B.S., L.D., G.L., F.A., F.M., C.G., P.M. and M.N. generated data, L.D., G.L., S.D. and Ph.M. designed experiments; V.G. performed histological analysis; N.L.C., R.C., B.B., D.B. designed and provided essential tools; L.D., G.L., A.L. analyzed the data; L.D., G.L., N.L.C., R.C. prepared the manuscript; A.L., S.D., F.A. and Ph.M. edited the manuscript; L.D., G.L. and Ph.M. provided experimental funding.

### **Lay summary**

Nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) is as an important modulator of polymorphonuclear (PMN)-induced liver injury such as in ischemia reperfusion (IR). Here, we show that NOD1 pathway targets liver adhesion molecule expression (ICAM-1 & VCAM-1) on endothelium and on hepatocyte through p38 and ERK signaling pathways. The early increase of adhesion molecule expression after reperfusion, emphasizes the importance of adherence molecules in liver injury severity. In this study we have generated PGLA-nanoparticles loaded with NOD1 antagonist. Nanoparticles have shown to reduce liver necrosis, by reducing PMN liver infiltration and adhesion molecules expression.

## **Abstract (241 words)**

**Objective:** In liver transplantation, organ shortage leads to use marginal grafts that are more susceptible to ischemia reperfusion (IR). We identified nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) as an important modulator of polymorphonuclear (PMN)-induced liver injury such as in IR. Here we aimed at elucidating its role in the liver IR, especially on the endothelium and hepatocyte.

**Design:** NOD1 WT and KO mice were treated with NOD1 agonists and submitted to liver IR. Expression of adhesion molecules were analyzed in total liver, isolated hepatocytes and endothelial cells. Interaction between PMN and hepatocyte was studied in *ex vivo* co-culture model using electron microscopy (EM) and LDH levels. We generated NOD1 antagonist-loaded nanoparticles (np ALINO).

**Results:** NOD1 agonist treatment increased liver injury, PMN tissue infiltration and up-regulated ICAM-1 and VCAM-1 expression 20 hours after reperfusion. NOD1 agonist treatment without IR increased expression of adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) in total liver and more particularly in WT hepatocytes, but not in NOD1 KO hepatocytes. This induction is dependent of p38 and ERK signaling pathways. As compared to untreated hepatocytes, NOD1 agonist markedly increased hepatocytes lysis in co-culture with PMN as shown by the increase of LDH in supernatants. Interaction between hepatocytes and PMN was confirmed by EM. In a mouse model of liver IR, treatment with np ALINO significantly reduced the area of necrosis, transaminase level and ICAM-1 expression.

**Conclusion:** NOD1 regulates liver IR injury through induction of adhesion molecules and modulation of hepatocytes-PMN interaction. NOD1 antagonist-loaded nanoparticles reduced liver IR injury and open up new perspectives to prevent IR especially in the context of liver transplantation.

## Introduction

In the field of liver transplantation, organ shortage is a major issue; especially in western countries where the living donor transplantation is still scarce. This situation led transplant units to use of liver allografts following donation after cardiac death along with marginal and extended criteria donors <sup>1</sup>. These marginal grafts are known to be more susceptible to early graft dysfunction and retransplantation, increasing morbidity and mortality<sup>2-5</sup> mostly due to liver ischemia reperfusion (IR) injuries <sup>6, 7</sup>. Liver IR is a biphasic phenomenon in which hypoxia-induced lesions are exacerbated after oxygen delivery is restored, shear stress and polymorphonuclear neutrophils (PMN) tissue infiltration <sup>8</sup>. This process of liver injury occurs also during hemodynamic instability and hepatic resection. It is a frequent cause of acute liver dysfunction <sup>2-5, 9, 10</sup>. Thus, preventing IR and its consequences remains a clinical challenge.

The pathophysiology of liver IR involves numerous cells (i.e. PMN, liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) and hepatocytes) and is considered to be an experimental model of PMN-mediated hepatitis <sup>3</sup>. The process of injury occurs during the reperfusion phase with PMN infiltration. The first step of this event is the interaction between PMN and the endothelium, allowing PMN to enter into the liver parenchyma. The upregulation of adhesion molecules (i.e. ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin) on LSEC follows reperfusion, allowing PMN recruitment with the rolling process <sup>12</sup> through the binding of neutrophil adhesion molecules L-Selectin and Mac-1, an heterodimeric integrin (CD11b/CD18) <sup>13</sup>. The dual role and interaction between endothelium and PMN is accepted to be a cornerstone of the pathophysiology of liver IR. Thus, inhibiting adhesion molecule expression (as ICAM, VCAM, E-Selectin, CD44 and PECAM) or using blocking antibodies have been largely studied to reduce liver injury <sup>14</sup>.

Contrary to the endothelium, the mechanisms driving the interaction between PMN and hepatocytes during liver IR remain to be clarified. The expression of adhesion molecules by the hepatocyte has been suggested to be important for its interaction with PMN during IR<sup>15</sup>. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) has been shown to be expressed on hepatocyte plasma membrane under IR conditions<sup>15</sup>. However, it remains unclear whether the regulation of ICAM expression on the hepatocyte impacts the severity of IR lesions.

There is evidence that damage-associated molecular patterns (DAMPs) and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) activate PMN<sup>16 17</sup> leading to IR-mediated liver injury. We previously showed that activation of the nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1), a cytosolic pattern recognition receptor (PRR), was responsible for activation of PMN function and migration<sup>18</sup>. Indeed, by activating mitogen-activated protein (MAP) kinases such as p38, NOD1 leads to PMN infiltration in the liver, facilitating injury in a model of liver IR. At the opposite, NOD1 knockout (KO) mice were protected against liver IR injury<sup>18</sup>. In addition, NOD1 is significantly expressed in the liver and in hepatocytes<sup>19</sup>, thus NOD1 pathway appears as promising for liver IR injury regulation.

The aim of our study was to dissect the role of the NOD1 pathway on the expression of adhesion molecules in the liver, and more specifically in endothelial cells and in hepatocytes. As IR lesions are induced by PMN liver parenchyma infiltration, we also explored the modulation of hepatocytes and PMN interaction by NOD1. Then, as a proof of concept, we have tested NOD1 as a potential therapeutic target with the use of a NOD1 inhibitor for the prevention of IR lesions in a mouse model.



## **Methods**

### ***Reagents***

Three different NOD1 agonists were used in this study. The natural ligand iE-DAP (1  $\mu$ g/ml *in vitro* and 5 mg/kg *in vivo*) and its derivative C12-iE-DAP (100 ng/ml *in vitro* and 3.3 mg/kg *in vivo*) were obtained from InvivoGen (Toulouse, France). FK565 (synthetic ligand,  $10^{-6}$ M *in vitro* and 1 mg/kg *in vivo*) was obtained from Dr. M. Chamaillard. TNF $\alpha$  (50 ng/ml) and IFN $\gamma$  (100ng/ml) were obtained from R&D (Lille, France). We used ML-130 (Notilinib) and ALINO73 (analog of SB711<sup>20</sup>) synthesized by Natascha Leleu-Chavain as described as NOD1 antagonists<sup>20, 21</sup>. The ERK inhibitor (U0126, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) and p38 inhibitors (SB203580, InvivoGen, Toulouse France) were used at 10 $\mu$ M. Resomer RG503H was used as a PLGA (polylactic-co-glycolic acid) matrix (Evonik Industries AG, Deutschland). (Supplementary CTAT Table)

### ***Animals***

C57BL/6J wild-type mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France), Nod1 KO (C57BL/6J background)<sup>18</sup> and their wild-type littermates (Nod1 WT) were used in this study. Animals were kept in a controlled environment (12 h light/dark cycles) and fed a standard rodent pellet diet (RM1, Special Diet Service, France) ad libitum. Experiments performed on animals were approved by the local ethics committee (n° 01757.01) in accredited facilities (n°B59-35010) according to government guidelines (n°2010/63/UE).

### ***IR injury***

We used a murine model of 70% partial hepatic ischemia for 60 min. Mice were or were not treated with a NOD1 agonist 24h and 4h before surgery. Then mice were anesthetized with 10 mg/kg xylazine and 100 mg/kg ketamine, and a midline laparotomy was performed. The left lateral and median lobes of the liver were ligatured using Ethicon mersutures F2541 (Ethicon, Issy Les Moulineaux, France). After 60 min of ischemia, the

ligature was removed to initiate hepatic reperfusion. Mice were sacrificed 3hours (for hepatocyte isolation of the *ex vivo* experiment) or at 4, 8 and 20 hours after reperfusion. Blood and liver samples were collected for analysis at each time point. Liver samples were fixed in paraformaldehyde 4% (w/v in PBS) and paraffin embedded or snap frozen.

### ***Cell isolation and culture***

PMN were isolated following sterile peritonitis as previously described<sup>23</sup>. Briefly, mice received an i.p. injection of 1 mL of a solution of oyster glycogen at 150µg/µL in phosphate buffer saline (PBS). Sixteen hours later mice were sacrificed and peritoneal cells were harvested using 5 mL of sterile PBS without Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>. Exudate cells were determined to be >95% neutrophils by flow cytometry.

Hepatocytes were isolated by the collagenase perfusion method<sup>23</sup>. Briefly, mice were anesthetized with 2% isofluran. After laparotomy, the portal vein was cannulated (24G catheter, Terumo, Guyancourt, France). The liver was then perfused for 10 to 20 minutes at 5 mL/min with washing buffer (HBSS W/O Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>, EDTA 0.5 mM, HEPES 50 mM), then perfused with collagenase buffer (HBSS W/O Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>, HEPES 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, Collagenase type IV 0.0025% 850 CDU/mg (C5138, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 6 minutes at 5ml/min.

Following perfusion, the liver was collected in washing buffer and the Glisson's capsule was cut. Cell suspension was filtered in a 70 µM cell strainer. Cells were washed twice with washing buffer and centrifuged at 50g for 2 minutes at room temperature to pellet murine hepatocytes. Hepatocytes were then washed with hepatocyte culture medium (DMEM Glutamax, glucose 4.5 g/L, Gentamycin 1%, FCS 10%, 10<sup>-7</sup> M dexamethasone) and centrifuged at 500g for 5 minutes. One million hepatocytes were plated in 6-well plate (Sarstedt, Marnay, France).

The main challenge to investigate the hepatocyte expression of adhesion molecules was to avoid any contamination of LSEC during the isolation of the mouse primary hepatocytes. To deal with this contingency, we have optimized our experimental method and check the purity of isolated hepatocyte by FACS using CD31 as a marker for endothelial cell contamination. Considered acceptable a purity > 99% (supplementary figure1). In addition a cytopspin followed by cell staining were performed before *in vitro* and *ex vivo* analysis to confirm purity.

Primary Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from Prof. Eric Boulanger (Lille, France) and were maintained in endothelial cell basal medium supplemented with Bullet Kit (EBM-2) on a culture flask coated with 0.1% gelatin and maintained at 37°C with humidified of 5% carbon dioxide. HUVEC cultured from passages 4 to 8 were used for the experiments.

### ***Hepatocyte and PMN co-culture***

Freshly isolated hepatocytes were plated on a 48-well plate ( $1.25 \times 10^5$  cell per well) and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 36 hours. Purified peritoneal PMN ( $6.25 \times 10^5$  cell per well) were or were not added to the hepatocyte culture for 4 hours in HBSS medium (w/o phenol red). Supernatants were then harvested and centrifuged at 500g for 5 min to discard cells and debris. These supernatants were used to quantify lactate dehydrogenase (LDH) activity using the manufacturer's protocol (Roche, Boulogne-Billancourt, France).

### ***Real-time RT-PCR for mRNA quantification***

Real-time PCR analyses were performed for quantification of mRNA expression. Mouse glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) was used as a housekeeping gene. Sequence-specific PCR primers were designated using Primer3 Software<sup>24, 25</sup>; see Table S1 and Supplementary CTAT Table for details). Total RNA was extracted from isolated hepatocytes or liver samples using Nucleospin®RNAII (Macherey-Nagel EURL,

Hoerdt, France). First strand cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in StepOne plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### ***Western blot***

For western blot studies, proteins were extracted from liver samples or isolated hepatocytes in a lysis buffer including PBS with 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 100mM Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) and a classical protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) as well as phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Fifty micrograms of total proteins were then separated by SDS-PAGE and electroblotted on nitrocellulose membranes. Membranes were incubated overnight with primary antibodies (see Table S2 and Supplementary CTAT Table for details). Immunodetection was completed with a secondary peroxidase-conjugated antibody (1:1000, Dako Laboratories, Trappes, France) and chemiluminescence was performed according to the manufacturer's protocol (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France).  $\beta$ -actin was used as a loading control. Band intensity was analyzed using the MM4000 Pro (CareStream, Noisy-le-Grand, France), quantified using Image J (NIH) and compared to  $\beta$ -actin. Results were expressed as relative units.

### ***Immunohistochemistry, necrosis area quantification & liver PMN quantification***

Liver samples were fixed in paraformaldehyde (PFA) 4% and embedded in paraffin. Four-micrometer-thick sections were exposed to primary antibodies after a specific step of heat-performed antigen retrieval (see Table S2 for details) and then to a biotinylated

secondary antibody for 1 h. After washing in TBS + 0.05% Tween 20, sections were incubated with streptavidin-horseradish peroxidase (Dako Laboratories, Trappes, France). Staining was revealed using 3,3'-diaminobenzidine substrate (Dako Laboratories) for 1 to 5 minutes before the reaction was stopped in distilled water, and counterstained with hematoxylin. Negative controls were incubated with irrelevant serum or isotype-matched immunoglobulin instead of the specific antibody. Stained slides were observed and analyzed under a microscope (Leica, Bensheim, Germany). Pictures were obtained using Axio Scan.Z1 (Zeiss, Göttingen, Germany).

Quantification of necrosis was obtained on digital images of IR livers (3 per mice) obtained from Axio Scan Z1 (Zeiss, Göttingen, Germany). The area of necrosis was defined as the ratio of (area of necrosis/ total liver area) x 100.

Quantification of PMN infiltration was performed by counting PMN on 8–10 fields of necrosis and/or centrilobular area (magnification, 400) for each mouse.

### ***Human ICAM-1 promoter analysis***

The proximal human ICAM-1 promoter was amplified from human liver genomic DNA using the following primers: forward primer (5'-AGGGAGCTCTCGTCAAGATCCAAGCTAGCTG-3') and (5'-GGAAGATCTGTGATCCTTTATAGCGCTAGCC-3') corresponding to fragments between -895 and -57 upstream from ATG. The purified fragment was cloned in the multiple cloning site of the reporter plasmid pGL4.10 [luc2] (Promega, France) using SalI and BglII (NEB, USA). This construct (Prom ICAM, figure 5B) was amplified and purified before sequencing to confirm correct integration of the promoter. CV-1 cells (ATCC<sup>®</sup> CCL-70<sup>™</sup>) were plated in 48-well plates (40000 cells/well) and transfected with empty pGL4.10 [luc2] or Prom ICAM (100 ng/well) and a human NOD1 expression vector (20 ng/well, pHA-NOD1 kind gift from

Dana J. Philpott). After 20 hours, cells were washed and lysed for luminescence quantification.

### ***Nanoparticle synthesis, formulation and characterization.***

Poly-Lactic co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles (np) were prepared as previously described <sup>26</sup>. The Resomer RG503H (10mg) was dissolved in 1ml of an organic phase consisting of acetone and ethanol (85:15). After complete dissolution of the Resomer, it was injected into 10ml water by stirring for 30 minutes at room temperature (21 to 24 °C). Organic solvents were then evaporated with a rotary vacuum evaporator at 120rpm, 28°C for 4 minutes. The resulting nanoparticles are used as a control (np). Association with the NOD1 antagonist was performed by post-loading and adding the antagonists into the nanoparticle suspension. ML130 was dissolved in DMSO at 100mg/ml and loaded with np from 0.075% to 3% (w/w) for *in vitro* cell delivery corresponding to treatment from 0.125 to 5µM (NP-ML130). ALINO73 was dissolved in DMSO at 20mg/ml and loaded with np from 0.2% to 4% (w/w) for *in vitro* cell delivery corresponding to treatment from 0.25 to 5µM (npALINO). For *in vivo* delivery, ALINO73 was loaded at 7.5% (w/w NP) and 5% (w/v) of glucose was added to the final suspension to compensate for osmolarity.

The *in vivo* formulation of np ALINO was characterized for size (Z-Average = 92.8 nm) and zeta potential (-11.8 mV) respectively by dynamic light scattering and electrophoretic mobility analysis on a ZetaSizer NanoZS (Malvern Instrument, France). The poly dispersity index (PDI) was 0.259.

### ***Statistics***

Data were expressed as medians, means ± SEM or means ± SD. All comparisons were analyzed using the Mann & Whitney test. Statistics were calculated using GraphPad Prism

version 5.0, (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered to be statistically significant if  $p$  was  $<0.05$ .

## Results

### ***Induction of adhesion molecule expression in liver of mice treated with NOD1 agonists, in normal condition (without liver IR)***

Twenty hours after treatment with NOD1 agonist injection in normal condition (without liver IR), mouse livers displayed significant induction of proteins ICAM-1 and VCAM-1, two important adhesion molecules (1.4 RU vs. 0.8 RU,  $p=0.032$  and 0.25RU vs. 0.00 RU,  $p=0.008$  respectively), compared to vehicle-treated mice. There was no effect of NOD1 agonist on E-selectin and P-selectin protein expression (figure 1A). The immunostaining of ICAM-1 showed that NOD1 agonist treatment increased ICAM-1 expression not only on endothelium but also on hepatocyte membranes compared to untreated livers which mainly displayed endothelial staining (figure 1B).

### ***NOD1 agonist increases liver IR injury and up-regulates ICAM-1 and VCAM-1.***

Twenty hours after IR, liver of mouse treated with NOD1 agonist displayed more necrosis area than those treated with vehicle (figure 2A). The kinetic analysis of PMN infiltration in liver parenchyma revealed that regardless NOD1 treatment; there was no PMN infiltration 4 hours after reperfusion. It became significant 8 hours after reperfusion. At 8 and 20 hours after reperfusion, the NOD1 agonist treatment significantly induced PMN liver infiltration as compared to vehicle treatment. Upon NOD1 agonist treatment KC was up regulated 20 hours after reperfusion. (figure 2B)

Four hours after reperfusion, transaminases increased (AST  $2078 \pm 350$  IU/L vs.  $1921 \pm 346.5$  IU/L and ALT  $2885 \pm 547.7$  IU/L vs.  $2610 \pm 385$  IU/L) without differences between the two treatment conditions (NOD1 ago vs. vehicle). ALT increased at 8 hours of reperfusion, and were significantly higher in the NOD1 agonist group ( $3910 \pm 25$  IU/L vs.  $3139.6 \pm 292.5$  IU/L;  $p=0.05$ ) whereas AST were not different in each group ( $1802.0 \pm 137.3$



IU/L vs.  $1905 \pm 159.6$  IU/L). At 20 hours of reperfusion, the NOD1 agonist conditions presented significantly higher values of transaminase than vehicle conditions (AST  $3173 \pm 96$  IU/L vs.  $2402 \pm 109$  IU/L;  $p < 0.01$  and ALT  $4627 \pm 78$  IU/L vs.  $3062 \pm 52$  IU/L;  $p < 0.01$ ) (figure 2C).

NOD1 agonist treatment up-regulated Icam-1 and Vcam-1 mRNA expression at early time point after reperfusion (4 hours) (figure 2D). This mRNA overexpression began before PMN infiltration and the establishment of histological necrosis (Supplementary figure 2). At a protein level, ICAM-1 and VCAM-1 were significantly induced 20 hours after reperfusion in mice treated with NOD1 agonist (ICAM-1: 1.8 to 2.6 RU;  $p = 0.049$  and VCAM-1: 0.37 to 0.94 RU;  $p = 0.049$ ) (figure 2E).

Considering other adhesion molecules, there was no difference of expression after NOD1 agonist treatment in liver IR condition for E-selectin and P-selectin ( $p < 0.05$ ) (figure 2E).

### ***NOD1 pathway targets ICAM-1 and VCAM-1 expression in vitro in primary endothelial cell and hepatocyte***

HUVEC were cultured and exposed to NOD1 agonist at different dosage (0, 0.1 and 1  $\mu$ g). The mRNA expression of Icam-1, Vcam-1 and E-selectin were induced by NOD1 agonist treatment in a dose dependent manner. However, Pecam mRNA expression was not significantly modified by NOD1 activation (figure 3A).

Mouse primary hepatocytes were cultured *in vitro*. Before analysis, the purification of isolated cells was confirmed (hepatocyte purity > 99%, supplementary figure 1). Primary hepatocytes were then exposed to NOD1 agonists under basal or inflammatory (TNF/IFN) conditions. As shown in figure 3B, Icam-1 mRNA was induced twice in Nod1 wild-type (WT) hepatocytes treated with the NOD1 agonist, as well as under inflammatory conditions

induced by TNF/IFN. Vcam-1 mRNA was significantly induced by NOD1 activation (1.2 RU vs 3.3 RU,  $p=0.005$ , figure 3A). Induction of Icam-1 and Vcam-1 mRNA expression was synergistic with the NOD1 agonist and TNF/IFN treatments (figure 3B). These data were confirmed at the protein level in mouse primary isolated hepatocytes which showed that ICAM-1 and VCAM-1 were significantly increased by the NOD1 agonist both under basal and inflammatory conditions (figure 3D). To confirm the specificity of the NOD1 agonist, hepatocytes were isolated from Nod1 KO mice and exposed to NOD1 agonist treatment under basal and inflammatory conditions. Real-time PCR and Western-blot showed that the NOD1 agonist did not induce ICAM-1 and VCAM-1 in NOD1 KO hepatocytes but responded to TNF/IFN treatment (figure 3C,E).

#### ***NOD1 pathway targets ICAM-1 and VCAM-1 expression ex vivo in hepatocyte***

In *ex-vivo* conditions, NOD1 agonist treatment of sham operated mice induced significant hepatocyte expression of Icam-1 and Vcam-1 mRNA (6-fold and 10-fold increase, respectively) compared to vehicle-treated animals (figure 4A). IR alone also induced Icam-1 and Vcam-1 mRNA (4 fold and 5-fold increase, respectively). NOD1 activation during IR markedly increased hepatocyte Icam-1 and Vcam-1 mRNA expression (25-fold and 20-fold increase, respectively) compared to vehicle-treated sham animals (figure 4A). At the protein level, NOD1 agonist treatment in sham-operated mice strongly induced hepatocyte expression of ICAM-1 and VCAM-1 (7.1-fold and 4.0-fold, respectively, figure 4C) compared to untreated mice. After 3 hours of reperfusion, induction of the ICAM-1 and VCAM-1 proteins also increased significantly (2.1-fold and 2.0-fold respectively, figure 4C). NOD1 agonist treated Nod1 WT mice that underwent liver IR showed massive induction of hepatocyte expression of ICAM-1 and VCAM-1 protein (37-fold and 109-fold, respectively) compared to vehicle-treated sham animals. More importantly, NOD1 agonist treatment increased ICAM-1

and VCAM-1 protein expression by 17.7 and 54.5 fold respectively upon liver IR conditions (figure 4C).

In Nod1 KO mice, the NOD1-mediated induction of ICAM-1 and VCAM-1 expression was blunted both following IR or a sham-operation (figure 4B,D).

### ***NOD1 activation in hepatocytes amplifies the interaction with PMN and subsequent lysis***

Examination of the co-culture by electron microscopy revealed important adhesion of PMNs on hepatocytes which showed signs of distress such as swelling of mitochondria, cytoplasm clarification and lysosome (figure 5A).

Hepatocytes isolated from Nod1 WT mice that were or were not treated with a NOD1 agonist showed low levels of spontaneous lysis when cultured alone (figure 5B). A significant increase in LDH activity was observed when hepatocytes from untreated mice were co-cultured with PMN isolated from untreated WT mice. When hepatocytes from NOD1 agonist-treated mice were co-cultured with PMN isolated from untreated WT mice, there was a significant increase in LDH activity compared to hepatocytes from vehicle-treated animals (figure 5B).

To confirm the specificity of NOD1 in relation to this event, we reproduced these experiments with hepatocytes isolated from Nod1 KO mice treated or not with a NOD1 specific agonist. As observed in figure 5C, targeting of Nod1 KO hepatocytes by PMN was reduced and NOD1 agonist-induced lysis was completely blunted.

### ***NOD1 signaling pathways driving ICAM-1 and VCAM-1 expression in hepatocytes***

A liver active form of ERK (phospho ERK) was induced from 10 to 30 min after treatment with a NOD1 agonist (figure 6A). A similar pattern was observed for p38 since

active phospho p38 was induced at 10 and 30 min and then returned to the steady state 60 min after stimulation with a NOD1 agonist (figure 6B). Treatment with the ERK inhibitor (U0126) significantly limited the increase in Icam-1 and significantly blocked the Vcam-1 mRNA overexpression induced by the NOD1 agonist (figure 6C-D). The p38 inhibitor (SB203580) further blocked NOD1-induced hepatocyte Icam-1 and Vcam-1 mRNA expression. Co-treatment with both ERK and p38 inhibitors did not increase blockade of the NOD1 effect.

*In vitro*, we first cloned the human ICAM-1 promoter (figure 6E) and showed that NOD1 activation by an agonist resulted in a 50% increase in luciferase activity driven by this promoter compared to untreated cells (figure 6F).

### ***NOD1 antagonist development to prevent IR-induced liver injury***

ML130 and ALINO73 are two specific NOD1 inhibitors that have been identified by screening different libraries of chemical compounds for activation or inhibition of NOD receptors<sup>20, 21</sup>. In an *in vitro* model that allows evaluation of NOD1 activation, cells were treated with a NOD1 agonist and increasing doses of either ML130 or ALINO73 (supplementary figure 3A-B). Treatment with a NOD1 agonist induced significant expression of the reporter gene (SEAP, OD<sub>655</sub> 0.165±0.014). Addition of ML130 resulted in a dose-dependent decrease in NOD1 activity from 0.16µM (OD<sub>655</sub> 0.106±0.014) to maximum inhibition at 5µM (OD<sub>655</sub> 0.013±0.014). Treatment with ALINO73 led to dose dependent inhibition of NOD1 activity from 0.16µM (OD<sub>655</sub> 0.197±0.020 vs 0.140±0.021) to maximum inhibition at 2.5µM (OD<sub>655</sub> 0.030±0.014).

Because both NOD1 antagonists are not soluble in injectable vehicles used for *in vivo* applications, ML130 and ALINO73 were associated with PLGA nanoparticles to facilitate *in vivo* delivery to the liver.

The effect of antagonist-loaded nanoparticles on NOD1 activity was tested in the same *in vitro* system as above (supplementary figure 3C-D). As shown in supplementary figure 3C when ML130 was associated with PLGA nanoparticles, it lost its inhibitory potential on NOD1 activity, ALINO73-loaded nanoparticles (np ALINO) appeared to be at least as effective as free ALINO73 for the dose-dependent inhibition of NOD1 activity *in vitro* (supplementary figure 3D).

### ***Modulating IR-induced liver injury with NOD1 antagonist nanoparticles***

np ALINO was then used to test the *in vivo* potential of NOD1 antagonists. Mice received an intravenous injection of nanoparticles that was either empty (np Empty) or loaded with the NOD1 inhibitor (np ALINO) before undergoing one hour of ischemia. As shown in figure 7A, mice treated with np Empty displayed large areas of IR-induced necrosis. However, when treated with the np ALINO the area of necrosis was lower in mouse livers ( $26.0\pm 3.2\%$  vs  $15.6\pm 2.9\%$ ,  $p=0.038$ ) (figure 7B-C). These results were confirmed by determining serum transaminase. After treatment with np ALINO, serum ALT significantly decreased compared to treatment with empty nanoparticles ( $3935\pm 493$  IU/L vs  $5814\pm 615$  IU/L,  $p=0.040$ ) (figure 7D). This improvement was associated with a lower liver expression of KC mRNA and lower infiltration of PMN in liver parenchyma, whereas the PMN in centrilobular vessels were unchanged (figure 7E-7F). The expression of ICAM-1 in the liver was reduced after treatment with np ALINO, as observed using immunohistochemistry (figure 7G).

## DISCUSSION

We have demonstrated in this study that NOD1 pathway modulates liver IR injury through the induced expression of adhesion molecules. These adhesion molecules are mainly ICAM-1 and VCAM-1 and are expressed on LSEC as well as on hepatocytes. With an exploratory experiment using NOD1 antagonist-loaded nanoparticles, we strongly suggest that targeting NOD1 *in vivo* is able to reduce liver IR injury in part by reducing the expression of ICAM-1 in the liver.

NOD1 has been previously shown to impact liver IR through increased CD11b expression in PMN<sup>18</sup>. However, the role of NOD1 pathway in the liver, and more specifically the expression of adhesion molecules on hepatocyte and endothelium was unknown. Numerous studies have demonstrated the clear impact of adhesion molecules, especially on endothelium for the regulation of histological lesions and PMN tissue infiltration<sup>14, 27, 28</sup>. Our study emphasizes the role of NOD1 on adhesion molecule expression in the pathophysiology of liver IR. Indeed, ICAM-1 and VCAM-1 expression were increased upon NOD1 agonist treatment during liver IR. This up-regulation of adhesion molecules in the whole liver and hepatocyte occurred within the first hours of reperfusion, before necrosis establishment and PMN infiltration. This early expression of adhesion molecules is then probably a part of the first steps of pathophysiological mechanisms at the origin of reperfusion lesions.

At a cellular level, and more precisely in the context of *in vitro* culture of endothelial cells, E-selectin in addition to ICAM-1 and VCAM-1 is largely expressed and modulated after NOD1 pathway activation. However, the absence of significant induction of E-selectin expression after NOD1 activation at the whole organ level suggests that the endothelium is not the exclusive actor of expression of adhesion molecule in the liver. The *ex-vivo* and *in vitro* experiments demonstrate that hepatocytes are able to express ICAM-1 and VCAM-1 and these last are inducible upon NOD1 agonist treatment. Other adhesion molecules (CD44, P-

selectin, PECAM) have been screened on hepatocytes, but with no significant modulation of their expression by NOD1 agonist (data not shown).

Although it is central, the PMN/hepatocyte interaction during IR has not been as extensively investigated as the PMN/endothelial interaction. During warm/cold ischemia, endothelial tissue is injured<sup>29</sup>, sinusoidal endothelial cells are detached and sloughed into the sinusoid lumen<sup>30</sup>, allowing PMN direct access to the hepatocyte<sup>31, 32</sup> as confirmed by our analysis by electron microscopy (EM) (supplementary figure 4). We then designed a co-culture experiment to model the PMN/hepatocyte interface and clarify the hepatocellular role of NOD1 activation in this interaction. EM analysis of our model confirmed the direct interaction between both cell types leading to hepatocyte death. Quantification of LDH shows that activation of NOD1 in the hepatocyte increases hepatocellular death upon PMN binding. The results of the interaction between Nod1 KO hepatocyte and PMN suggest that blocking hepatocyte NOD1 could prevent PMN-induced hepatocyte death *in vitro*.

In relation to the intracellular pathway, the effect of NOD1 appeared mediated through ERK and p38 phosphorylation in hepatocytes. The regulatory effect of ERK and p38 inhibitors confirms the role of the MAPK pathway in NOD1-mediated ICAM-1 and VCAM-1 expression. These findings support data obtained in other cellular types such as PMN<sup>18, 19</sup>.

NOD1 is expressed widely in many organs and cell types<sup>33</sup>. The clinical potential of NOD1 antagonists could be extended to other organs such as renal IR pathogenesis<sup>34</sup> or myocardium infarct<sup>35</sup>. In the kidney, Nod1 deficient mice are partially protected from IR-induced kidney injury. NOD1 activation by diaminopimelic acid worsens cardiac IR injury in particular through p38 MAPK. Nod1 knockdown using siRNA in cardiomyocytes attenuates cell death. The role of NOD1 in innate immune cells suggests that NOD1 antagonists should be evaluated for sepsis<sup>36</sup> or PMN-related hepatitis (i.e. alcoholic hepatitis)<sup>37-39</sup>. The present

results can serve as a basis for future studies investigating the therapeutic potential of NOD1 antagonists.

Our results and previous studies performed in the liver<sup>18, 19</sup> strongly support evaluating the proof of concept for the use of NOD1 antagonists to prevent liver IR injury. Previous screening of chemical libraries on NOD receptors<sup>20</sup> led us to choose two prototypic NOD1 inhibitors from 2 different chemical entities based on their optimal IC<sub>50</sub>: ML130 and ALINO73 with the greatest inhibitory effect (supplementary figure 3). ML130 and ALINO73 are insoluble in aqueous solutions and insufficiently soluble in non-toxic hydrophobic solvents. Because these low hydrophilic properties prevented their use *in vivo*, we used nanoparticles to transport insoluble NOD1 antagonists to the liver<sup>40</sup>. We choose PLGA nanoparticles because of their high biocompatibility and FDA approved safety. PLGA is currently used in several drugs such as: Sandostatin LAR© (USAN (United States Adopted Name): Octreotide)<sup>41</sup> for neuroendocrine tumors, Bydureon© (USAN: Exenatide)<sup>42</sup> in diabetes and Risperdal Consta© (USAN: Risperidone) in schizophrenia<sup>43</sup>.

The *in vitro* testing of PLGA nanoparticles loaded with ML130 or ALINO73 showed that np ML130 was not effective while np ALINO inhibited NOD1 activity at least as efficiently as free ALINO73 suggesting a high bioavailability despite the PLGA integration. In mice, this NOD1 antagonist-loaded nanoparticle, np ALINO, decreased the area of necrosis induced by liver IR by about 40%. This decrease in histological lesions was associated with a 33% decrease in serum transaminase supporting npALINO as an interesting therapeutic approach to prevent liver IR. The npALINO treatment was also associated with lower KC mRNA expression in the liver, lower PMN infiltration and reduced ICAM expression. The reduction of KC expression could have reduced total amount of PMN recruited to the liver. Indeed, npALINO did not impact the number of PMN in centrolobular vessels, but reduced significantly the severity of PMN infiltration in necrosis areas. These results raise the



therapeutic potential of NOD1 antagonists in preventing hepatic IR in humans. The use of NOD1 antagonists should be tested during different steps of liver transplantation. These NOD1 antagonists could be use either in the donor before the organs are harvested, or added to the preservation protocol, as well as a treatment during reperfusion in the recipient.

In conclusion, this study states that NOD1 regulates adhesion molecules expression in the liver. NOD1 activation and blockage experiments confirm that NOD1 pathway modulates the severity of liver IR injury. These data complement the impact of NOD1 on PMN function and migration. Thus NOD1 has a dual role and targets two different actors implicated in reperfusion injury. However, the relative contribution of each actor (PMN or adhesion molecule) on liver IR injury is unclear. New experiments are needed to puzzle out the full mechanism of NOD1 pathway. This work supports the development of NOD1 inhibitors.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS:**

Authors would like to thank Nathalie Jouy, Anne Loyens and Meryem Tardivel from the Flow Core Facility – BioImaging Center Lille (F-59000 Lille, France) for the access and excellent technical support. Thanks to Melanie Legrand, Cyril Degraeve, Amélie Mine, Emeline Gorecki, Justine Beauchamp, Mélanie Bollier, Perrine Six and Arnaud Dendooven for technical assistance.

## REFERENCES

1. Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R, et al. Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1995;59:197-203.
2. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992;53:957-78.
3. Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1083-8.
4. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, et al. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000;32:169-73.
5. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181:160-6.
6. Lee DD, Singh A, Burns JM, et al. Early allograft dysfunction in liver transplantation with donation after cardiac death donors results in inferior survival. *Liver Transpl* 2014;20:1447-53.
7. Merion RM, Pelletier SJ, Goodrich N, et al. Donation after cardiac death as a strategy to increase deceased donor liver availability. *Ann Surg* 2006;244:555-62.
8. Peralta C, Jimenez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol* 2013;59:1094-106.
9. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G15-26.
10. Glanemann M, Langrehr JM, Stange BJ, et al. Clinical implications of hepatic preservation injury after adult liver transplantation. *Am J Transplant* 2003;3:1003-9.

11. Caldwell-Kenkel JC, Thurman RG, Lemasters JJ. Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers. *Transplantation* 1988;45:834-7.
12. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-34.
13. Steinhoff G, Behrend M, Schrader B, et al. Intercellular immune adhesion molecules in human liver transplants: overview on expression patterns of leukocyte receptor and ligand molecules. *Hepatology* 1993;18:440-53.
14. Ala A, Dhillon AP, Hodgson HJ. Role of cell adhesion molecules in leukocyte recruitment in the liver and gut. *Int J Exp Pathol* 2003;84:1-16.
15. Benkoel L, Doderio F, Hardwigsen J, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM- 1) during ischemia-reperfusion in human liver tissue allograft: image analysis by confocal laser scanning microscopy. *Dig Dis Sci* 2003;48:2167-72.
16. Lu L, Zhou H, Ni M, et al. Innate Immune Regulations and Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplantation* 2016;100:2601-2610.
17. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26 Suppl 1:173-9.
18. Dharancy S, Body-Malapel M, Louvet A, et al. Neutrophil migration during liver injury is under nucleotide-binding oligomerization domain 1 control. *Gastroenterology* 2010;138:1546-56, 1556 e1-5.
19. Scott MJ, Chen C, Sun Q, et al. Hepatocytes express functional NOD1 and NOD2 receptors: a role for NOD1 in hepatocyte CC and CXC chemokine production. *J Hepatol* 2010;53:693-701.
20. Rickard DJ, Sehon CA, Kasparcova V, et al. Identification of selective small molecule inhibitors of the nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) signaling pathway. *PLoS One* 2014;9:e96737.

21. Khan PM, Correa RG, Divlianska DB, et al. Identification of Inhibitors of NOD1-Induced Nuclear Factor-kappaB Activation. *ACS Med Chem Lett* 2011;2:780-785.
22. Yamashita T, Ishibashi Y, Nagaoka I, et al. Studies of glycogen-induced inflammation of mice. Dynamics of inflammatory responses and influence of antiinflammatory drugs and protease inhibitors. *Inflammation* 1982;6:87-101.
23. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976;13:29-83.
24. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 2007;23:1289-91.
25. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012;40:e115.
26. Le Broc-Ryckewaert D, Carpentier R, Lipka E, et al. Development of innovative paclitaxel-loaded small PLGA nanoparticles: study of their antiproliferative activity and their molecular interactions on prostatic cancer cells. *Int J Pharm* 2013;454:712-9.
27. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* 2011;17:1391-401.
28. Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, et al. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:79-89.
29. Selzner N, Rudiger H, Graf R, et al. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003;125:917-36.
30. Gao W, Bentley RC, Madden JF, et al. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998;27:1652-60.
31. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990;4:3355-9.

32. Imamura H, Brault A, Huet PM. Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology* 1997;25:664-71.
33. Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, et al. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2014;14:9-23.
34. Shigeoka AA, Kambo A, Mathison JC, et al. Nod1 and nod2 are expressed in human and murine renal tubular epithelial cells and participate in renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol* 2010;184:2297-304.
35. Yang H, Li N, Song LN, et al. Activation of NOD1 by DAP contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury via multiple signaling pathways. *Apoptosis* 2015;20:512-22.
36. Cartwright N, Murch O, McMaster SK, et al. Selective NOD1 agonists cause shock and organ injury/dysfunction in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:595-603.
37. Takahashi T, Kamimura T, Ichida F. Ultrastructural findings on polymorphonuclear leucocyte infiltration and acute hepatocellular damage in alcoholic hepatitis. *Liver* 1987;7:347-58.
38. Taieb J, Delarche C, Paradis V, et al. Polymorphonuclear neutrophils are a source of hepatocyte growth factor in patients with severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2002;36:342-8.
39. Lazaro R, Wu R, Lee S, et al. Osteopontin deficiency does not prevent but promotes alcoholic neutrophilic hepatitis in mice. *Hepatology* 2015;61:129-40.
40. Park JK, Utsumi T, Seo YE, et al. Cellular distribution of injected PLGA-nanoparticles in the liver. *Nanomedicine* 2016;12:1365-74.
41. Zhang Y, Sophocleous AM, Schwendeman SP. Inhibition of peptide acylation in PLGA microspheres with water-soluble divalent cationic salts. *Pharm Res* 2009;26:1986-94.

42. Qi F, Wu J, Hao D, et al. Comparative studies on the influences of primary emulsion preparation on properties of uniform-sized exenatide-loaded PLGA microspheres. *Pharm Res* 2014;31:1566-74.
43. Rawat A, Bhardwaj U, Burgess DJ. Comparison of in vitro-in vivo release of Risperdal((R)) Consta((R)) microspheres. *Int J Pharm* 2012;434:115-21.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1: NOD1 activation induced liver expression of adhesion molecules under physiological condition**

A: Representative Western-blot of livers extracted from C57BL/6 mice treated with vehicle or NOD1 agonist (FK565). ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin (from right to left panel) protein expression were compared to  $\beta$ -actin. Lower panel histograms represent ratio of band intensity of the adhesion molecules compared to  $\beta$ -actin. Results are expressed as relative units (RU). Statistical significance is indicated.

B: Representative ICAM-1 immunostainings of livers extracted from mice only treated with vehicle (left panel) or NOD1 agonist (iE-DAP) (right panel). Negative controls are included (upper right corner). Livers from vehicle-treated mice displayed significant staining on sinusoids. After NOD1 agonist treatment, sinusoidal staining was reinforced and a marked staining was observed on hepatocytes.

### **Figure 2: NOD1 activation induced liver expression of adhesion molecules after liver IR**

A: Representative H&E histological picture of livers extracted from C57BL/6 mice that underwent ischemia/reperfusion (IR) and were treated with vehicle (IR+Vehicle, Left panel) or NOD1 agonist (iE-DAP) (IR+NOD1 agonist, right panel). Dashed lines circle areas of liver injury.

**B:** Histograms representing liver PMN count and relative expression of liver KC mRNA 4, 8 and 20 hours (hrs) after reperfusion in C57BL/6 mice treated with vehicle (IR+Vehicle, white bars) or NOD1 agonist (IR+NOD1 agonist, black bars). Results are expressed as mean  $\pm$ SEM. Statistical significances are indicated.

**C:** Kinetic determination of transaminase AST (left panel) and ALT (right panel) in C57BL/6 mice serum 4, 8 and 20 hours after reperfusion and treatment with vehicle (grey line) or

NOD1 agonist (black line). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical significances are indicated.

**D:** histograms representing early (4 hours after reperfusion) liver expression of Icam-1 and Vcam-1 mRNA in C57BL/6 mice treated with vehicle (IR+Vehicle, white bars) or NOD1 agonist (IR+NOD1 agonist, black bars). Results are expressed as mean  $\pm$ SEM. Statistical significances are indicated.

**E:** Representative Western-blot of liver extracted 20hours after reperfusion from C57BL/6 mice treated with vehicle (IR+Vehicle) or NOD1 agonist (IR+NOD1 agonist). ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin (from right to left panel) protein expressions were compared to  $\beta$ -actin. Lower panel histograms represent the ratio of band intensity of the adhesion molecules compared to  $\beta$ -actin. Results are expressed as relative units (RU). Statistical significance is indicated.

**Figure 3: NOD1 activation induces hepatocyte expression of ICAM-1 and VCAM-1.**

**A:** mRNA expression of Icam-1, Vcam-1, E-selectin and PECAM (from upper to lower panel) in HUVEC

**B-C:** mRNA expression of Icam-1 (upper panel) and Vcam-1 (lower panel) in primary hepatocytes isolated from Nod1 KO mice (C) or their wild-type littermates (Nod1 WT mice, B). Cells were treated with vehicle or NOD1 agonist (FK565) and/or TNF 50 ng/ml and IFN $\gamma$  100 ng/ml (TNF/IFN $\gamma$ ). Results are expressed as relative units (RU). Statistical significance was indicated.

**D-E:** Representative western-blot for quantification of ICAM-1 (upper blot) and VCAM-1 (lower blot) protein expression that were compared to  $\beta$ -actin. Primary hepatocytes isolated from Nod1 KO mice (D) or their wild-type littermates (Nod1 WT mice, C), were treated with



vehicle or a NOD1 agonist (FK565) and/or TNF 50 ng/ml and IFN $\gamma$  100 ng/ml (TNF/IFN $\gamma$ ). Results are expressed as relative units (RU). Statistical significance is indicated.

**Figure 4: During ischemia reperfusion, NOD1 pathway induced hepatocyte expression of adhesion molecules.**

**A-B:** *Ex-vivo* mRNA expression of Icam-1 (upper panel) and Vcam-1 (lower panel) in primary hepatocytes isolated from Nod1 KO mice (B) or their wild-type littermates (Nod1 WT mice, A). Mice were treated or not with NOD1 agonist (FK565) after sham surgery or ischemia/reperfusion (isch/reperf). Results are expressed as relative units (RU). Statistical significance is indicated.

**C-D:** Representative western-blot for quantification of ICAM-1 (upper blot) and VCAM-1 (lower blot) protein expression that were compared to  $\beta$ -actin in *ex vivo* primary hepatocytes. Nod1 KO mice (D) or their wild-type littermates (Nod1 WT mice, C), were treated or not with a NOD1 agonist (FK565) after sham surgery or ischemia/reperfusion (isch/reperf). Ratios of band intensity are indicated as relative units (RU).

**Figure 5: NOD1 pathway activation leads to hepatocyte lysis by neutrophils.**

Co-culture experiments to assess hepatocyte (Hepato) and neutrophil (PMN) interaction and cell lysis. **A:** Representative cytology formed by electronic microscopy of the interaction between neutrophils (PMN) and hepatocytes (Hep). **B:** Primary hepatocytes were isolated from wild-type mice (Hepato WT) treated or/not with a NOD1 agonist (FK565). Then hepatocytes were co-cultured (or not) with PMN harvested from wild type mice. Dosage of LDH in co-culture supernatants (relative unit, RU). **C:** Primary hepatocytes were isolated from Nod1 KO mice (Hepato KO) treated or/not with a NOD1 agonist (FK565). Then

hepatocytes were co-cultured (or not) with PMN harvested from wild type mice. Dosage of LDH in co-culture supernatants (relative unit, RU).

**Figure 6: NOD1 signaling and ICAM-1 promoter**

**A-B:** Ratio of band intensity of phospho MAPkinases compared to total MAPkinases from western-blot performed on liver extracts from C57BL/6 mice 0, 10, 30, 60 minutes after treatment with a NOD1 agonist (iE-DAP). Mean±SD are represented (n=6) and statistical significance is indicated as \* for p<0.05 as compared to baseline (time point 0 min). Lower panel corresponds to representative Western-blot. **A:** Liver ERK (p42/p44) activation. **B:** Liver p38 activation.

**C-D:** Histograms for mRNA expression of Icam-1 (C) and Vcam-1 (D) in hepatocytes treated or not with a NOD1 agonist (iE-DAP) and with an ERK inhibitor (U0126, 10µM) and/or a p38 inhibitor (SB203580, 10µM). Results are expressed as relative units (RU, Mean±SEM, n=5-10). Statistical significance is indicated as \* for p<0.05 or \*\* for p<0.01. Untreated control (white bar) was compared to positive control (NOD1 agonist treatment, black bar). Inhibitor treated cells (grey bars) were compared to positive control (black bar)

**E:** Schematic diagram representing 838bp of human ICAM-1 promoter been cloned in the reporter vector, pGL4. NF-κB response element (red boxes) and AP-1 (blue boxes) response elements are indicated. Transcription starts are represented as (Γ➔) and ATG is indicated as a purple box. **F:** CV-1 cells are transfected or not with human a NOD1 expression vector (phNOD1) and transfected or not with a reporter vector containing human ICAM-1 promoter (hICAM prom). Cells with different transfection conditions are treated or not with a NOD1 agonist (C12-iE-DAP). The human ICAM-1 promoter activity is evaluated using luminescence and quantified as relative light units (RLU). Statistical significance is indicated as \*.

**Figure 7: Use of antagonists to target NOD1 in liver.**

C57BL/6 mice received an iv injection of empty (np Empty) or ALINO73-loaded nanoparticles (np ALINO) with a dose corresponding to 5 mg/kg of ALINO73. n=13 in each group. Six hours later mice underwent 60 min of ischemia and 20 hours of reperfusion.

**A-B:** Image of mouse liver histology (H&E staining) following IR injury. **C:** Liver from mouse that underwent IR and treated with empty PLGA nanoparticles (IR + np Empty) display large injury areas (surrounded by dotted lines). **D:** Liver from mouse that underwent IR and treated with ALINO73-loaded nanoparticles (IR + np ALINO). Injury areas are obviously more limited.

**C:** Quantification of liver necrotic areas from mouse that underwent IR (Liver IR) and treated with empty PLGA nanoparticles (np Empty) and from mouse that underwent IR and treated with ALINO73-loaded nanoparticles (np ALINO). Results are expressed in percentage of necrotic surface among total liver surface as Mean±SEM.

**D:** Serum ALT expressed as international units/liter (IU/L) from mouse that underwent IR (Liver IR) and treated with empty PLGA nanoparticles (np Empty) and from mouse that underwent IR and treated with ALINO73-loaded nanoparticles (np ALINO). Statistical significances are indicated.

**E:** Histogram representing liver PMN count 20 hours after reperfusion (Liver IR) in mice treated with empty PLGA nanoparticles (np Empty) and mice treated with ALINO73-loaded nanoparticles (np ALINO). PMN infiltrating liver parenchyma (Extravasated PMN, white bars) or in centrilobular veins (PMN in vessels, grey bars) were distinguished. Results are expressed in number of PMN per field of necrosis (magnification x400) as mean ±SEM. Statistical significances are indicated.

**F:** Histogram representing liver expression of KC mRNA 20 hours after reperfusion in mice treated with empty PLGA nanoparticles (np Empty) and mice treated with ALINO73-loaded

nanoparticles (np ALINO). Results are expressed in relative units (RU) as mean  $\pm$ SEM. Statistical significances are indicated.

**G:** Representative ICAM-1 immunostainings of livers harvested from mice that underwent liver IR and were treated with empty nanoparticles (np Empty, left panel) or with np ALINO (right panel)

Figure 1 :

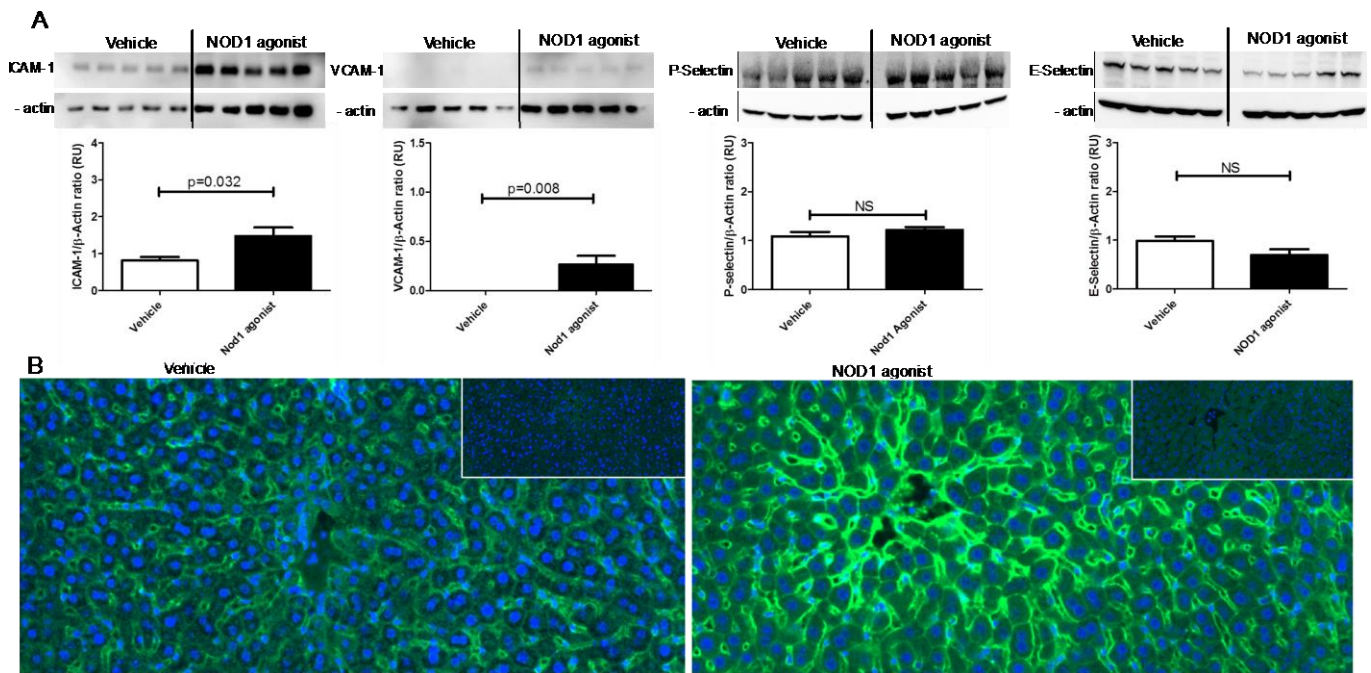


Figure 2 :

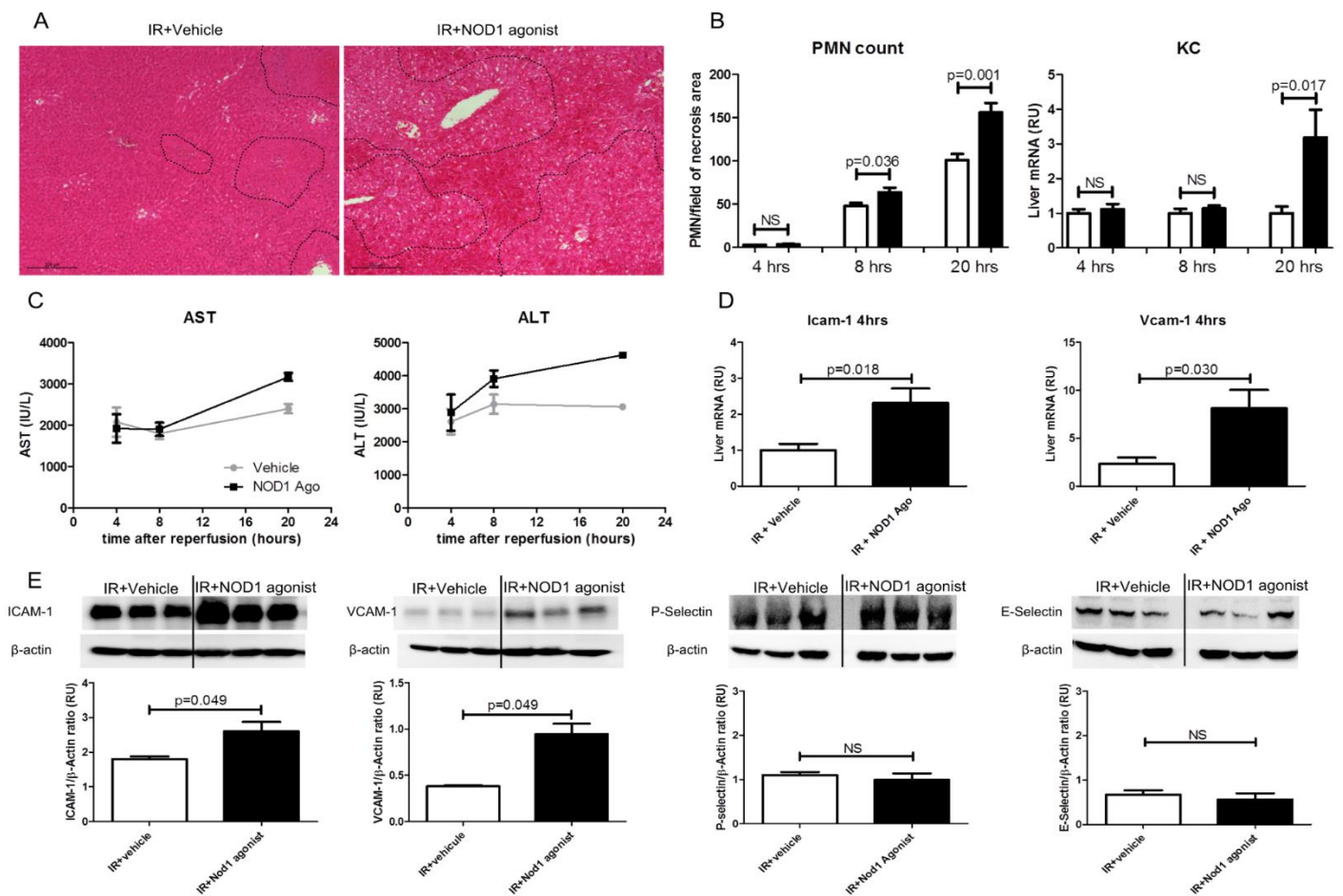


Figure 3:

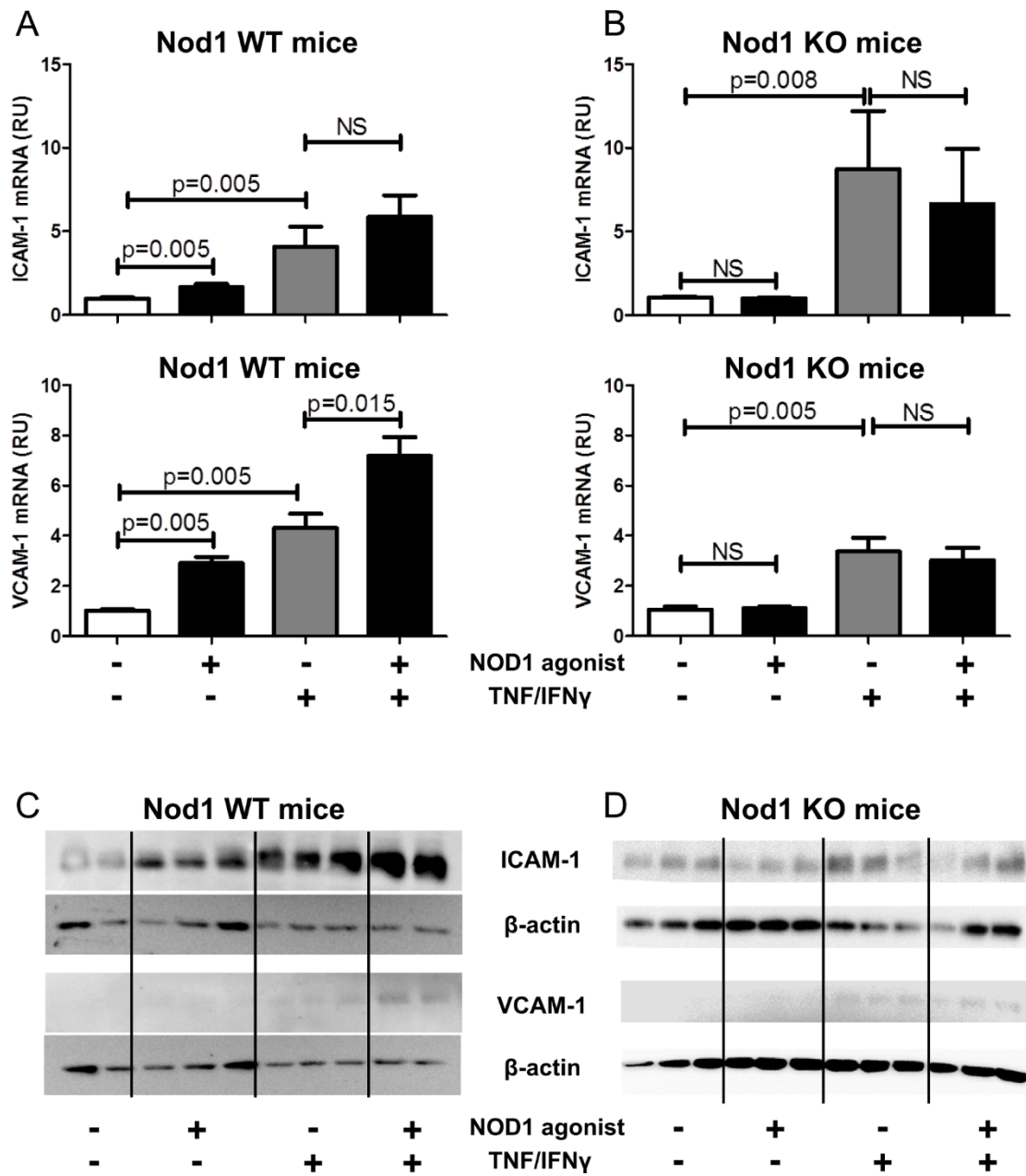


Figure 4 :

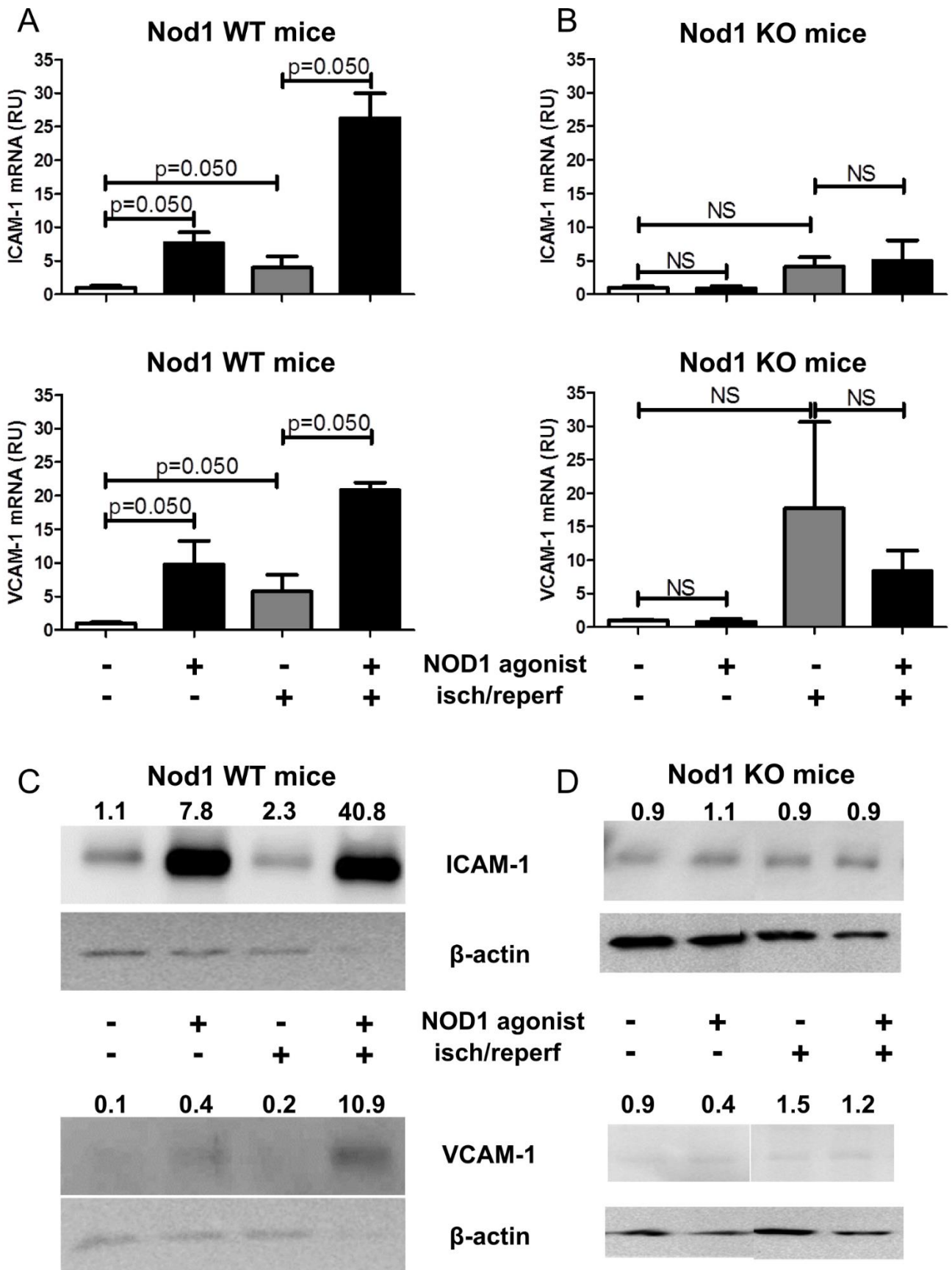
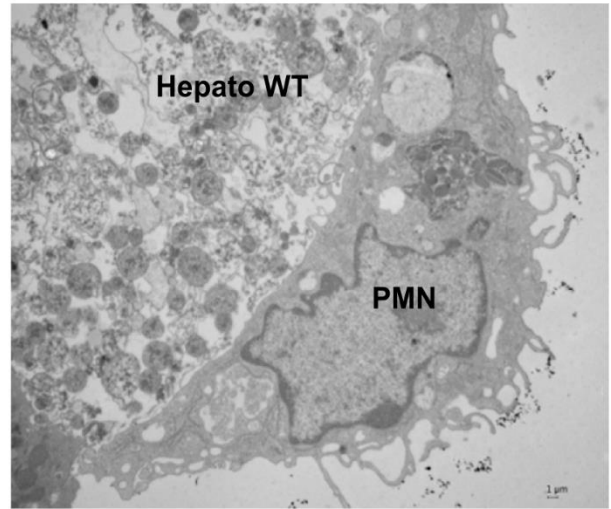
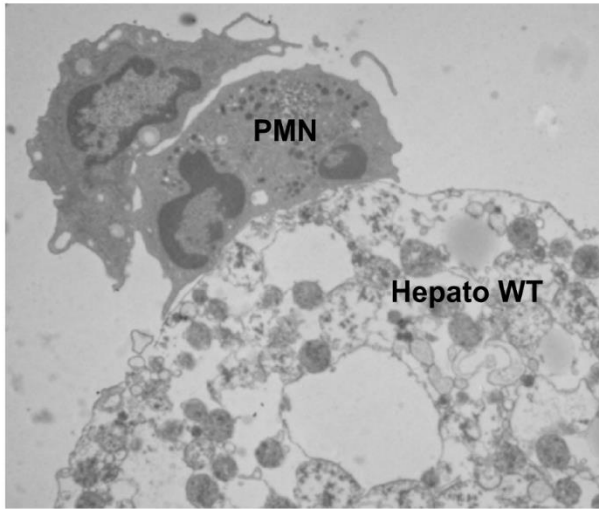
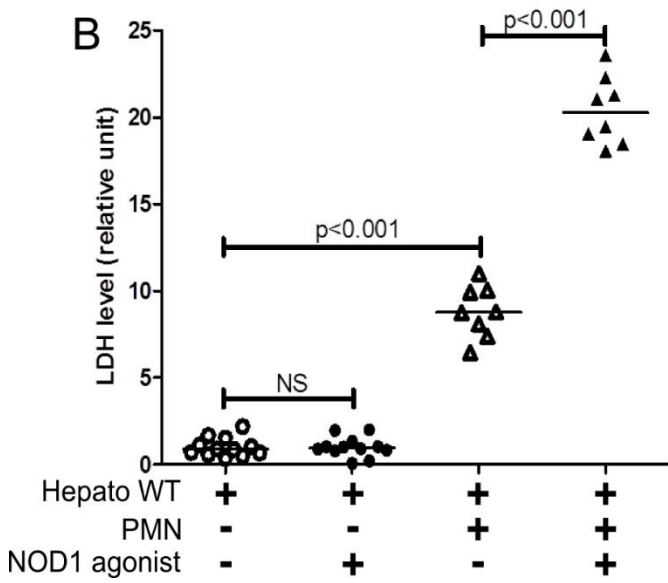


Figure 5:

A



B



C

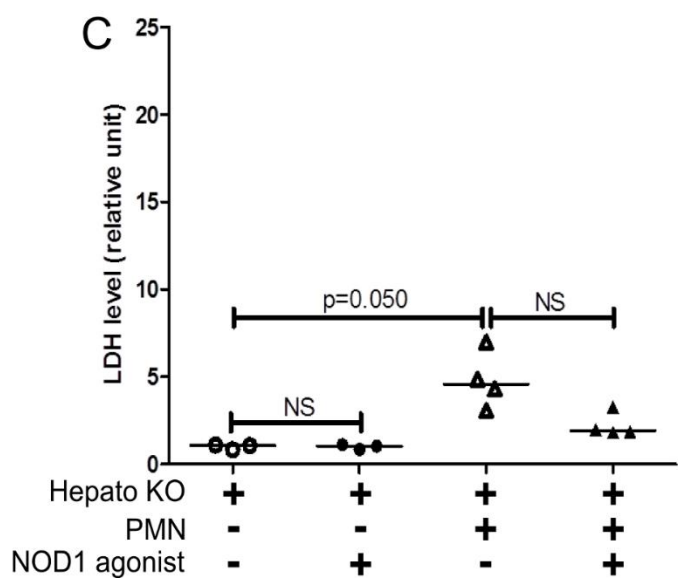




Figure 6:

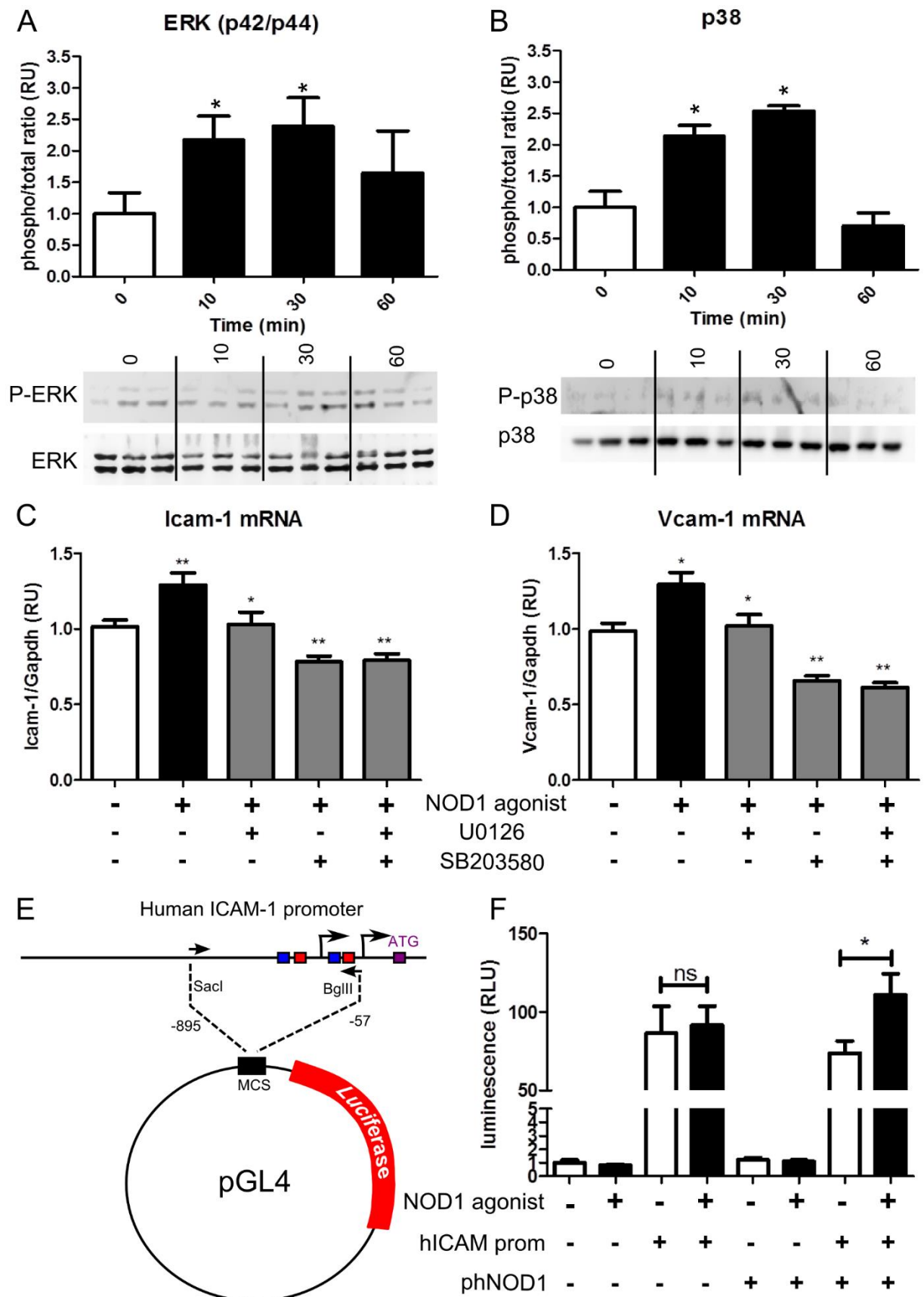
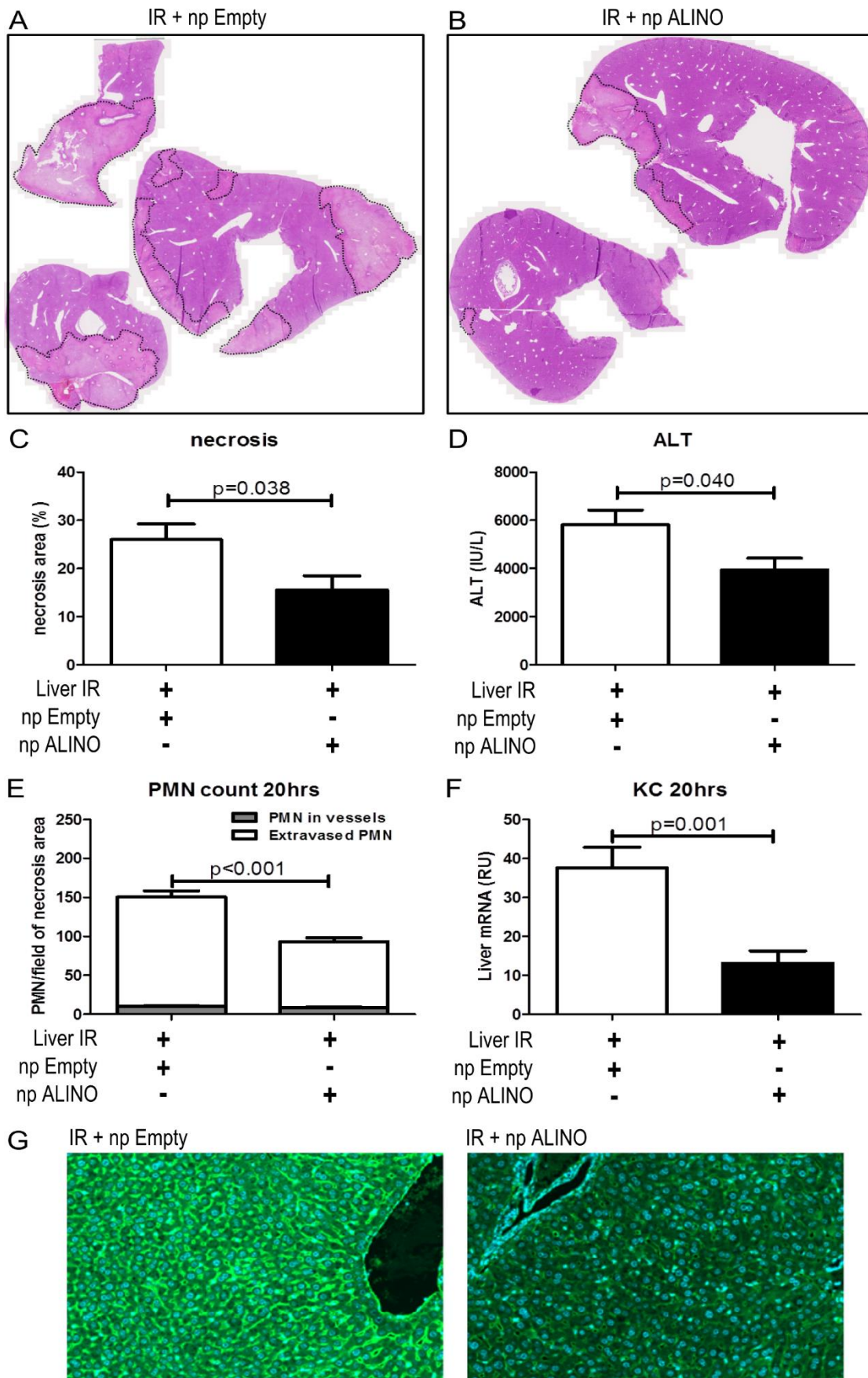


Figure 7 :



## 2-3- Conclusion générale du manuscrit 2 :

Cette étude a permis de démontrer que la voie NOD1 est essentielle dans la modulation des lésions IR par l'induction de l'expression des molécules d'adhésion notamment ICAM et VCAM au niveau des hépatocytes et des cellules endothéliales. L'expression de ces molécules d'adhésion a pour conséquence de favoriser l'interaction du PNN avec l'hépatocyte et par la suite favoriser la nécrose hépatocytaire. Le traitement in-vivo dans un modèle murin d'IR avec des antagonistes NOD1 (chargés dans des nanoparticules) a pour conséquence de diminuer les zones de nécrose au niveau hépatique.

Ces résultats sont en concordance avec nos datas préliminaires obtenue sur l'analyse de séquençages issus de la microdissection laser des hépatocytes de patient HA comparé à ceux provenant de patients cirrhotiques et de patients contrôles. Nos résultats démontrent une augmentation de l'expression de NOD1 ainsi que les molécules d'adhésion ICAM au niveau des hépatocytes HA. Ces résultats laissent suggérer que nos datas obtenues sur l'interaction du PNN avec l'hépatocyte par le biais de la voie NOD1 dans le modèle d'IR serait présente dans le contexte d'une HA. Nos datas sur la microdissection laser des hépatocytes d'HA démontrent également une augmentation de l'expression de certaines chimiokines et cytokines attractantes du PNN, combinée avec une expression accrue de NOD1 et d'ICAM au niveau hépatocytaire. Tous les éléments sont présents en faveur d'une nécrose induite de l'hépatocyte par le PNN dans l'HA.

En perspective, nous allons confirmer sur le plan protéique l'expression de NOD1, d'ICAM et de VCAM sur les hépatocytes de patients HA par marquage IHC et par WB sur des hépatocytes isolés à partir de foie de patients HA. Nous essayerons également d'explorer l'effet de la surexpression de NOD1 sur des hépatocytes humains pour essayer d'identifier des gènes cibles pouvant être impliqués dans le processus de recrutement des PNN via ce

récepteur. Nous utiliserons un système de co-culture de PNN avec des hépatocytes isolés de patients HA, traités ou non avec des nanoparticules contenant des antagonistes de NOD1, pour évaluer l'efficacité thérapeutique du blocage du signal NOD1 dans le but de diminuer la nécrose hépatocytaire observée chez les patients atteints d'HA.

### 3- IL-33/ST2 pathway regulates neutrophil migration and predicts outcome in severe alcoholic hepatitis

#### 3-1- Introduction générale manuscrit 3 :

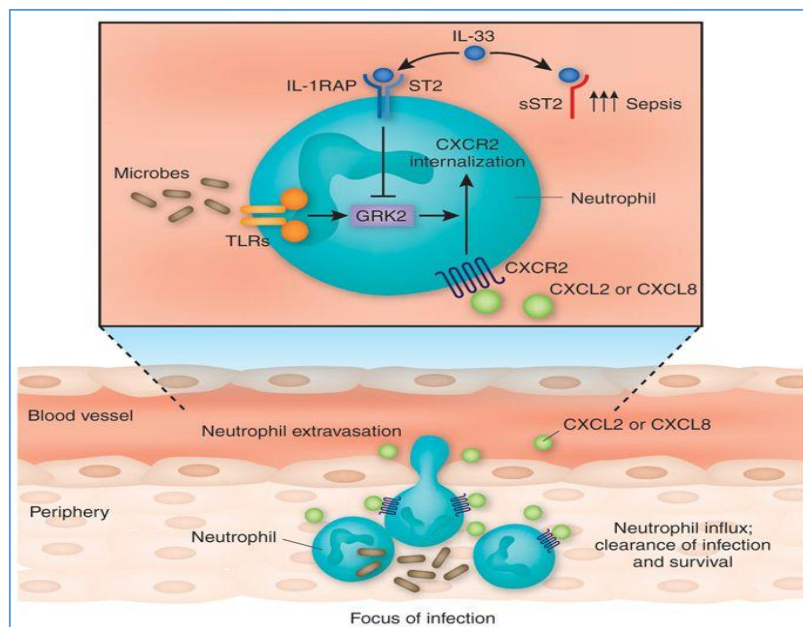
Parmi les déterminants de la mortalité dans les cas d'hépatite alcoolique sévère, l'infection est l'un des principaux problèmes sur lesquels notre groupe s'est penché (Louvet et al., 2009). Dans ce travail, l'infection était un événement fréquent (environ 25% des patients) et était principalement observée chez les non-répondeurs aux stéroïdes (40% des non-répondeurs avaient développé une infection grave). Cependant, le lien étroit entre la non-réponse au traitement et l'incidence de l'infection n'a pas été évalué. En outre, à côté des non-répondeurs aux stéroïdes présentant un risque élevé de mortalité, certains répondeurs aux corticostéroïdes développent également des infections graves et meurent prématurément. Le profil de tous ces patients en termes de réponse immunitaire est très peu documenté dans la littérature.

Le PNN, acteur essentiel du système immunitaire est fortement infiltré dans le foie de patients HA. Cependant il a été montré comme ayant une phagocytose altérée (Mookerjee et al., 2007) et un pouvoir oxydatif diminué (Boussif et al., 2016). Les patients atteints d'HA présentent une neutrophilie importante. Ces données suggèrent donc que les PNN circulants ont des fonctions altérées au cours de cette pathologie.

Une des fonctions importantes du PNN est sa capacité à pouvoir migrer au site de l'infection. Nous avons donc décidé dans ce papier d'évaluer la capacité migratoire du PNN, en évaluant la voie de signalisation de l'IL33 décrite dans la littérature pour avoir un rôle important dans la migration, notamment au niveau du sepsis.

L'IL-33 est une cytokine principalement impliquée dans les réactions allergiques et le sepsis (Oboki et al., 2010) (Alves-Filho et al., 2010). La caractérisation de sa voie, y compris

de son récepteur ST2 (existant sous forme membranaire et soluble), a également été réalisée dans les réponses à cellules T (Kakkar and Lee, 2008). Récemment, il a été démontré que l'activation de la voie IL-33-ST2 peut être associée à une diminution du risque infectieux dans un modèle murin de sepsis (Alves-Filho et al., 2010). Dans cette étude, le rôle positif de l'IL-33 était lié à un impact sur GRK-2 qui était directement activé par le TLR-4, et avait pour rôle de réguler l'expression du récepteur à la chimiokine CXCR2 (Figure 13). Dans ce contexte, l'activation de la voie IL33 dans le PNN avait pour rôle de favoriser sa fonction de migration vers les sites infectieux. Le récepteur TLR-4 est activé par le lipopolysaccharide (LPS), une molécule clé impliquée dans la septicémie ainsi que dans les maladies alcooliques du foie.



**Figure 14** : la voie IL33 dans le PNN au cours du sepsis (Roger and Calandra, 2010)

L'IL-33 a été découverte pour la première fois en 2003 en tant que facteur nucléaire à partir des veinules à endothélium épais (Baekkevold et al., 2003). En 2005, Schmitz et al ont identifié l'IL-33 comme un membre de la famille IL-1 et un ligand du récepteur ST2 (Schmitz et al., 2005). L'IL-33 est principalement produite par les cellules endothéliales, cellules épithéliales qui constituent la première ligne de défense de l'hôte contre les agents pathogènes (Xu et al., 2017) . Il a donc été proposé que l'IL-33 serait une alarmine impliquée dans la

détection des dommages et signalant aux cellules voisines la présence d'un pathogène (Pei et al., 2014).

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence une augmentation des taux sériques d'IL33 et de sST2 (forme soluble) chez les patients atteints de septicémie. Chez les enfants, il a été démontré que les taux sériques de sST2 et d'IL33 sont significativement augmentés durant le premier jour de sepsis, suggérant ainsi la possibilité d'utiliser le dosage de sST2 dans le diagnostic du sepsis chez l'enfant (Çekmez et al., 2016). Une autre étude a également montré chez l'adulte une augmentation des taux de ST2 sériques (sST2) durant les 24 à 48 heures du diagnostic du sepsis à l'admission (Brunner et al., 2004) (Hoogerwerf et al., 2010). Des études ont également montré une corrélation avec la mortalité des patients présentant des taux sériques élevés de ST2 (Hur et al., 2015).

Sur la base de la relation entre l'activation de la voie IL-33 / ST2 et la migration des neutrophiles, nous avons décidé d'évaluer le rôle de cette voie dans le PNN des patients HA, notamment au niveau de leur fonction migratoire.

**IL-33/ST2 pathway regulates neutrophil migration and predicts outcome in severe alcoholic hepatitis**

Florent Artru (1,2), Mohamed Bou Saleh (2), François Maggiotto (2), Guillaume Lassailly (1,2), Massih Ningarhari (1,2), Julie Demaret (2,3), Line-Carolle Ntandja-Wandji (1,2), Jean-Paul Pais de Barros (4), Julien Labreuche (5), Elodie Drumez (5), Doumet Georges Helou (6,7), Sébastien Dharancy (1,2), Emilie Gantier (2), Axel Périanin (8,9,10), Sylvie Chollet-Martin (6,7), Ramon Bataller (11), Philippe Mathurin (1,2), Laurent Dubuquoy (2), Alexandre Louvet (1,2)

(1) Hôpital Claude Huriez, Service Maladies de l'Appareil Digestif, CHU Lille, Lille, France

(2) Université de Lille / Inserm / CHU de Lille, U995 - LIRIC – Lille Inflammation Research Center, Lille, France

(3) Centre de Biologie-Pathologie, CHU de Lille, Lille, France

(4) INSERM, LNC UMR 1231, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

(5) Département de biostatistiques, CHU de Lille, Lille, France

(6) Inserm / Université Paris-Sud / Université Paris-Saclay, UMR996, Chatenay-Malabry, France

(7) Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Laboratoire d'immunologie « Autoimmunité et Hypersensibilités », Paris, France

(8) Inserm / Faculté de Médecine Xavier Bichat, UMRS-1149, Paris, France

(9) CNRS, ERL-8252 Centre de Recherche sur l'Inflammation, Paris, France



(10) Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire d'Excellence INFLAMEX,  
Paris, France

(11) Division of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Pittsburgh Liver Research  
Center, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

**Financial support:** the authors would like to thank the Association Française pour l'Etude du  
Foie (AFEF, French society of hepatology), the National Institute on Alcohol Abuse and  
Alcoholism (grant 1U01AA021908) and FAPEMIG Région Hauts de France for the financial  
support

**Abbreviations:** AH alcoholic hepatitis, ALD alcohol-related liver disease, Cirrh cirrhosis,  
CTL controls, CXCR2 C-X-C chemokine receptor type 2, DAMP damage-associated  
molecular pattern, GRK2 G-protein coupled receptor 2, IFN interferon, PMN  
polymorphonuclear neutrophils, SAH severe alcoholic hepatitis, TIPS transjugular  
intrahepatic portosystemic shunt, MIRU mean intensity with relative units, 3-HM 3-  
hydroxymyristate

**Corresponding authors :**

Prof. Alexandre Louvet & Dr. Laurent Dubuquoy

Service des maladies de l'appareil digestif and Unité INSERM 995

Hôpital Huriez

Rue Polonovski

F- 59037 Lille cedex

Phone 33 3 20 44 53 03

Fax: 33 3 20 44 55 64

E-mail: alexandre.louvet@chru-lille.fr

laurent.dubuquoy@inserm.fr

**Disclosures:** none of the contributing authors has disclosures related to this work

**Writing assistance:** none

**Authors' contributions:**

**Design of the study:** FA, PM, LD, AL

**Acquisition of data:** FA, MBS, FM, GL, MN, JD, LCNW, JPPDB, DGH, SD, EG, AP, SCM, PM, LD, AL

**Statistical analysis:** FA, JL, ED, AL

**Drafting of the manuscript and critical review:** FA, RB, PM, LD, AL

**Word count:** 5822

**Key words:** Alcoholic hepatitis, neutrophils, migration, IL-33, corticosteroids

**Lay summary**

Neutrophils of patients with severe alcoholic hepatitis is associated with a defect in the IL-33/ST2 pathway. This defect is associated with a higher probability of getting infected and is responsible for lower migration capacities. Administration of IL-33 to patient neutrophils restores at least in part this defect.

## ***Abstract***

**Background and aims:** Severe alcoholic hepatitis (SAH) is associated with a high risk of infection. The interleukin-33 (IL33)/ST2 pathway is involved in sepsis control but data in alcohol-related liver disease (ALD) are lacking. We aimed to characterize the role of IL-33/ST2 in the neutrophils (PMNs) of patients with ALD and SAH. **Methods:** Serum and circulating neutrophils were collected from patients with SAH, alcoholic cirrhosis (Cirrh) and healthy controls (Ctrl). We quantified the IL-33/ST2 pathway and CXCR2 at baseline and after exposure to IL-33. We also determined the migration capacity of PMN. **Results:** The decoy receptor of IL-33 (sST2) was increased in SAH vs. Cirrh and Ctrl, demonstrating the defect in this pathway during ALD. The sST2 level was associated with response to treatment, 2-month survival, infection-free survival and probability of infection in SAH. Endotoxemia was weakly correlated with sST2. GRK2, a negative regulator of CXCR2, was overexpressed in SAH and Cirrh PMNs and was decreased by IL-33. CXCR2 levels on PMNs were lower in SAH vs. Cirrh and Ctrl. Treatment with IL-33 partially restored CXCR2 expression in SAH and Cirrh. PMN migration upon IL-8 was lower in SAH and Cirrh vs. Ctrl. Treatment with IL-33 partially restored migration in SAH and Cirrh. Interestingly, the migration capacity of PMNs and the response to IL-33 were enhanced in responders to corticosteroids (Lille<0.45) compared to non-responders. **Conclusion:** The IL33/ST2 pathway is defective in SAH and predicts outcome. This defect is associated with decreased CXCR2 expression on the surface of PMNs and lower migration capacity, which can be corrected by IL-33, especially in patients responding to steroids. These results suggest a therapeutic potential in SAH and its infectious complications.

**Key words:** Alcoholic hepatitis, cirrhosis, infection, polymorphonuclear neutrophils, Interleukin-33, migration



## ***Introduction***

Severe alcoholic hepatitis (AH) is a life-threatening condition associated with short-term liver failure and a high risk of death. Severe AH is mainly defined by a Maddrey's discriminant function  $\geq 32$ <sup>1</sup> and cirrhosis is observed in more than 90% of cases<sup>2,3</sup>. The only treatment that has been shown to be effective in reducing short-term mortality (i.e. at 28 days) is prednisolone, 40 mg/day for 1 month<sup>4-6</sup>. In case of severe alcoholic hepatitis, the estimated short and medium term probability of death is around 20-30%. The Lille model is a helpful prognostic score which identifies patients that do not respond to medical treatment who are at high risk of death<sup>7</sup>. This model ranges from 0 to 1 and patients with a score  $> 0.45$  are classified as non-responders. There is no alternative pharmaceutical treatment for these patients to date and their outcome is poor.

Bacterial infections are one of the main drivers of the increased risk of mortality in severe AH. An estimated 25% of patients with severe AH are admitted with infection at diagnosis and that another 25% will develop infection during treatment with corticosteroids<sup>8</sup>. Thus, targeting infection in patients with severe AH is an attractive area of drug development.

There are multiple mechanisms associated with the increased risk of infection during alcohol-related liver disease, which involve different levels of the innate and adaptive immune system. For example, the antigen presentation function by antigen presenting cells is down regulated, monocyte and macrophage bacterial killing is reduced and T lymphocyte interferon (IFN) production in response to LPS is reduced<sup>9</sup>. The presence of a profound immune dysfunction in AH associated with a high level of circulating neutrophils may seem paradoxical. Some studies have reported an increased resting burst in circulating polymorphonuclear neutrophils (PMNs) which is in contrast with a reduced oxidative burst induced by *E. coli* and a decrease in phagocytosis capacities which has been suggested by some authors<sup>10-12</sup>. Another key function of PMN is the migration to the site of infection,

which seems to be impaired in decompensated alcohol-related cirrhosis<sup>13</sup>. When considering the crucial role of PMN in the resolution of sepsis, studies to understand which pathways are involved in impairment of PMN function, especially migration, are essential. The interleukin-33 (IL-33)/ST2 pathway is a potential target that could play a role in the high rate of infections in alcoholic liver disease, in particular in severe AH.

IL-33 is a member of IL-1 family that is mainly located in the nucleus of barrier cells such as epithelial cells and endothelial cells but also in several organs such as the lungs, skin, spleen and liver<sup>14-17</sup>. IL-33 participates in the regulation of gene expression but is also considered a damage-associated molecular pattern (DAMP) released after cell injury and/or necrosis especially in tissue macrophage<sup>18</sup>. Binding of IL-33 to the transmembrane form of ST2 (suppression of tumorigenicity 2) (ST2L) leads to subsequent activation of multiple intracellular signaling pathways which depend on cell type and location. In addition to IL-33/ST2 signaling on the cell surface, the ST2 gene also encodes a soluble form of the protein (sST2) lacking the transmembrane domain and acting as a decoy receptor for IL-33-inhibiting signal transduction of this pathway. In liver diseases, the IL-33/ST2 pathway has been involved in the pathogenesis of liver injury related to viral hepatitis, fatty liver disease, acute hepatitis and has been suggested to play a role in fibrogenesis<sup>19</sup>. It has been shown that the IL-33/ST2 pathway attenuates sepsis in the specific setting of infection without liver impairment by enhancing neutrophil influx to the site of infection (i.e. migration) via increased expression of chemokine receptor CXCR2 on circulating PMNs in animal models and ex vivo experiments<sup>20</sup>. Based on the relationship between IL-33/ST2 pathway activation and neutrophil migration we hypothesize that this pathway could play a role in the PMN immune dysfunction observed in alcoholic liver disease and severe AH.

The aims of our study were 1/ to characterize the role of the IL-33/ST2 pathway in the PMN of patients with ALD and severe AH 2/ to evaluate the impact of IL-33/ST2 pathway modulation on circulating PMN function *ex vivo*, especially migration capacities.

## ***Methods***

### *Patients*

This study included patients with severe alcoholic hepatitis (SAH), decompensated cirrhosis (Cirrh) and healthy controls (Ctrl). Subjects with SAH were included from a prospective cohort of consecutive patients (N=161), managed in the hepatology department of Hôpital Claude-Huriez, Lille, France. Alcoholic hepatitis was clinically suspected using the classical diagnostic criteria, i.e. recent onset of jaundice (less than 3 months), heavy alcohol consumption, clinical signs of hepatic decompensation (ascites, encephalopathy), elevated aminotransferases (less than 300 IU/l with aspartate aminotransferase (AST) > alanine aminotransferase) and high serum bilirubin levels (greater than 3.0 mg/dl) with no other identifiable cause of liver disease<sup>21</sup>. Alcoholic hepatitis was confirmed by liver biopsy in 148 patients (91.9% of cases) and diagnosis was based on the presence of the following criteria: hepatocellular damage (presence of Mallory bodies and hepatocellular ballooning), PMN infiltrate and steatosis associated with fibrosis<sup>21</sup>. In the remaining cases, liver histology was not available in 13 patients for the following reasons: 4 patients due to severe alterations in hemostasis contraindicating liver biopsy, 2 patients due to the presence of TIPS (Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt) and 7 patients for a procedure failure. Liver biopsy was performed according to standard clinical practice in France and not for research purposes. Severe alcoholic hepatitis was defined as a Maddrey's discriminant  $\geq 32$  and the severity of liver injury was also assessed by the MELD and Child-Pugh scores. After liver biopsy, 154 (95.6%) patients were treated with prednisolone (40 mg/day) for 7 days and therapeutic response was assessed by the Lille model<sup>7</sup>. Seven patients were not treated with prednisolone because of very severe liver dysfunction which is associated with a very low probability of response to steroids. A non-response to medical treatment was defined by a Lille model  $>0.45$  according to the ideal cut-off published in the original paper<sup>7</sup>. The response to medical



management in non-treated patients was also assessed by the Lille model as this model has also been shown to be effective in placebo-treated patients<sup>3-5</sup>. Systematic screening of infection was performed at admission and consisted of chest X-ray and blood, urine, and ascites cultures as published by our group<sup>8</sup>. During the follow-up, the same infection screening as that of admission was renewed in case of clinical or biologic signs of infection. Serum and plasma samples were collected before the initiation of treatment and at day 7 in patients treated with prednisolone. Serum and plasma samples were collected at diagnosis of SAH and 7 days thereafter in non-treated patients. It should be noted that patients were not included in the study if they developed sepsis between two blood samples.

#### *Clinical outcome*

Patients were followed-up for at least 2 months. Survival in patients with SAH was calculated from the first day of treatment with prednisolone to the last follow-up or liver transplantation (N=4). Survival in patients with decompensated cirrhosis was calculated from the time of blood sample collection. The status (alive or dead) of lost to follow-up patients was assessed by telephoning a family member, general practitioner, or both, or by contacting the death registry at the patient's birthplace. We prospectively recorded all infectious events to evaluate the incidence of infection in patients with SAH.

#### *Analyses performed*

Two types of analyses were performed in patients with SAH: cellular analyses on fresh neutrophils obtained from 2012 to 2019 (see below) and serum analyses on frozen samples

collected from 2006 to 2012 before the initiation of the study and then prospectively from 2012 to 2019 to increase the sample size. Diagnostic criteria and patient management were the same in the two cohorts of patients.

Patients with SAH were compared to patients with decompensated alcoholic cirrhosis but without superimposed SAH admitted to our unit during the study period. The diagnosis of cirrhosis was based on either liver biopsy, clinical, laboratory and/or imaging features. We also included healthy controls during the same study period.

The procedure for blood sample collection (cells, serum, plasma) was the same in SAH patients, patients with cirrhosis and healthy controls. To collect plasma and serum, blood samples were centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes at 4°C. We used the MACSxpress Neutrophil isolation human kit (ref. 130104434, Miltenyi Biotec, Germany) to isolate PMN. Briefly, 4.5 ml of whole blood were incubated with 2 ml of manufacturer's buffers in Falcon 15 ml tube for 5 minutes on the Macsmix rotator at 12 rpm. The tube was then placed on the MACSxpress Separator for 15 minutes at room temperature. The plasma supernatant was then collected with high purity PMNs. PMNs were incubated in the presence or absence of 50 ng/ml of recombinant human IL-33 50 ng/ml (ref. 3625-IL, Bio-Techne U.S.A) for 30 minutes at 37°C. Blood samples were collected when prednisolone was initiated (day 0 - D0) and 7 days thereafter (day 7 - D7) in the SAH group and at admission to the Cirrh group.

All patients agreed to participate in the study and written consent was obtained before analyses were performed. The study was registered under the number CPP14/67 at the "Comité de Protection des Personnes" of the Hauts de France region.

*IL-33 and sST2 level*

We assessed IL-33 and sST2 serum concentrations by ELISA using human IL-33 ELISA kit (ref. ADI-900-201, ENZO Life Sciences, U.S.A) and ST2 human kit (ref. DY523B-05, Bio-Techne U.S.A). Duplicate measurements were performed for each sample.

#### *Quantification of endotoxemia*

Endotoxemia was assessed using HPLC-MS/MS (high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry) to detect 3-hydroxymyristate (3-HM), a lipid component of LPS, in the serum of controls, patients with cirrhosis and patients with SAH. Methods are described in detail in Weil et al. and Pais de Barros et al.<sup>22,23</sup>

#### *Immunocytochemistry for GRK2*

200,000 PMNs were fixed with cold methanol for 30 seconds on Cytospin slides. Slides were incubated (or not as negative controls) overnight at 4°C with primary anti-GRK2 polyclonal rabbit antibody (ref. 137666, Abcam, U.K) and stained with secondary FITC–conjugated goat antibody to rabbit (ref. A11034 Life technologies, U.S.A). We captured images with a DM5500B microscope (Leica, Germany) equipped with DFC310 FX camera (Leica, Germany) and analyzed them by Leica Application Suite (LAS, Leica, Germany). All the cells from at least five randomly chosen fields in each slide performed in duplicate, were analyzed from at least two individual experiments. GRK2 expression was quantified in parallel for the entire set after defining thresholds using ImageJ software<sup>24</sup>. Correction for uneven illumination in fluorescence images has been performed in the same time. Results are expressed in mean intensity with relative units (MIRU).

#### *Flow cytometry analysis*

### *CXCR2 expression*

After isolation, we performed pretreatment of PMNs by IL-33 (50 ng/ml) or HBSS as described above for 30 min at 37°C. Surface staining of circulating PMNs with antibodies to CXCR2 (12-1829-42, eBiosciences) during 30 minutes at 4°C was performed and cells were then analyzed by a Cyan ADP (Beckman Coulter, U.S.A) For each condition, an isotype control tube (with mouse IgG1 k ISO control, eBiosciences) was used for non-specific signal subtraction.

### *SIGIRR expression*

Surface staining of circulating PMNs was performed using APC-labeled anti-SIGIRR (FAB990A, R&D Systems) during 15 minutes at room temperature. Cytometry analyses were performed on a Navios flow cytometer using the Navios software (Beckman Coulter).

### *Apoptosis assessment*

After isolation, we performed pretreatment of PMNs by IL-33 (50 ng/ml) or HBSS as described above for 30 min at 37°C. According to manufacturer's instructions, cells were washed with PBS and suspended in Annexin V Binding Buffer (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7 AAD, 640922, Biolegend). Cell staining was performed using FITC labeled Annexin V and 7-AAD viability staining solution. After 15 min of incubation at room temperature, Annexin V Binding Buffer was added prior to cell analysis on a Navios flow cytometer. Intact cells were lacking both expressions of Annexin V and 7-AAD and apoptotic cells were considered as cells expressing Annexin V but with low expression of 7-AAD.

### *Neutrophil functional tests*

### *Migration*

The migration capacity of PMN was assessed *ex vivo*<sup>25-27</sup>. Briefly, after isolation of PMNs 1.10<sup>6</sup> cells were deposited in the insert (Polycarbonate filter 3 µm) of transwell kits (ref. 3415, Corning, U.S.A). Five nM of recombinant human IL-8 (ref. 208-IL, Bio-Techne U.S.A) or 5 nM of recombinant human IL-8 plus IL-33 50 ng/ml in HBSS (red phenol, calcium and magnesium free) were added to the lower well. PMNs were then incubated for 1 hour at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. The insert was removed, the culture medium containing cells was collected and the number of cells were counted by FACS (LSR FORTESSA X20 cytometer (BD Biosciences, U.S.A) using Flow-Count Fluorospheres (ref. 7547053, Beckman Coulter, U.S.A).

### *Phagocytosis*

The Phagotest (ref. 341060, BD Bioscience) was used to measure phagocytosis using FITC-labeled opsonized E. coli bacteria. The mean fluorescence intensity of the respective antibodies on neutrophils was analyzed by FACS analysis with LSR FORTESSA X20 cytometer (BD Biosciences, U.S.A).

### *Statistical analysis*

Quantitative variables were expressed as medians with interquartile ranges. Categorical variables were expressed in numbers and percentages. Comparisons between quantitative variables were performed by the Mann-Whitney U test, paired-sample T Student test or Kruskal-Wallis, as appropriate. Correlations between quantitative variables were performed by calculating the Spearman's rank correlation coefficient. Strength of correlation was defined using the Spearman' coefficient (r): strong correlation if  $r > 0.75$ , moderate correlation if  $r > 0.5$  and weak if  $r < 0.5$ <sup>28</sup>. Two-month overall survival was calculated by the Kaplan-Meier method and intergroup comparison according to sST2 tertiles was done by the log-rank test.

We assessed the association between sST2 (treated as a continuous variable) and endpoints (2-month mortality or a composite of mortality and infection within the first 2 months) using Cox's proportional hazard regression model. The association between sST2 and infection at 2 months was performed using Fine and Gray's model by treating death as a competing risk. We derived effect sizes from Cox's and Fine and Gray's models by calculating hazard ratio (HR) per one standard deviation increase in sST2 as well as discrimination values by calculating the Harrell's c-index of agreement (using the approach of Wolbers and colleagues in presence of competing risk for infection outcome<sup>29</sup>). Finally, we drew ROC curves for 2-month prediction of overall and infection-free survival analyses. The significance level was set at 0.05 with a 2-sided test. All statistical analyses were performed using NCSS 2011 or SAS (version 9.4, SAS Institute, Cary, NC) software.

## **Results**

A total of 161 patients with SAH, 72 with severe cirrhosis and 28 healthy controls were included in the different analyses in the study. The main patient characteristics at inclusion are reported in Supplementary Table 1. As expected, compared to patients with cirrhosis, patients with SAH were younger (52.4 (42.6-58.6) vs. 58.2 (51.5-63.7) years,  $p<0.0001$ ), and had more frequently parameters indicative of systemic inflammation response syndrome (leukocyte count at 11.7 (8.7-15.1) vs. 8.6 (5.1-11.1) G/l,  $p=0.0005$  and CRP at 29 (21-39) vs. 12 (9-17) mg/l,  $p=0.0006$ ). Bilirubin was higher in the SAH group: 17.4 (10.9-29.1) vs. 5 (3.2-7.7) mg/dl,  $p<0.0001$  as well as the MELD score: 25 (22-31) vs. 20 (17-26),  $p<0.0001$ . However, Child-Pugh score was not different: 11 (10-12) vs. 10 (8-13),  $p=0.3$  and 2-month survival was not different in the two groups: 71.9 (65-78.8) vs. 66.6 (55.5-77.8),  $p=0.22$ , respectively.

### *IL-33/ST2 pathway is impaired in patients with SAH*

A total of 119 patients with SAH, 24 with severe cirrhosis and 12 healthy controls were included in the serum analysis part of the study. The main characteristics at inclusion are reported in Table 1 and are very close to the characteristics of patients with SAH described above.

Circulating IL-33 levels were relatively low in the three groups and we observed no significant difference between IL-33 levels of Ctrl (91.7 pg/ml, IQR 80.5-96.5), Cirrh (86 pg/ml, IQR 77.1-90.8) and SAH (107.7 pg/ml, IQR 80-147),  $p=0.12$  for comparison between Ctrl and SAH and  $p=0.11$  between Cirrh and SAH (Figure 1A). In contrast, there were marked differences in blood levels of the IL-33 decoy receptor (sST2), known to be the regulator of this pathway, between the three groups. The level of sST2 was increased in SAH

(415,062 pg/ml, 231,461-691,729) compared to Cirrh (191,511 pg/ml, 126,316-316,040;  $p<0.0001$ ) and Ctrl (16,545 pg/ml, 11,645-22,162;  $p<0.0001$ ). These results strongly suggest an attenuated IL-33/ST2 pathway in SAH compared to the other groups (Figure 1B). We then assessed the relationship between IL-33 and sST2 level and the response to steroid treatment according to the 0.45 cut-off of the Lille model. At baseline (initiation of prednisolone), serum levels of IL-33 were not different between responders (i.e. Lille  $<0.45$ ) and non-responders (i.e. Lille  $\geq 0.45$ ): 104.1 pg/ml (81.2-127.8) vs. 119.2 pg/ml (78.2-164.2),  $p=0.3$  (Figure 1C). In contrast, responders had lower sST2 levels at baseline than non-responders: 336,775 pg/ml (205,896 - 636,541) vs. 598,788 pg/ml (270,260 - 708,915),  $p=0.01$  (Figure 1D). These important results indicate that serum sST2 levels could be useful to predict response to prednisolone.

In SAH group, IL-33 levels were not different between D0 and D7 either on overall patients (107.7 vs. 109.2 pg/ml,  $p=0.2$ ), or in responders (104.1 vs. 106.6 pg/ml,  $p=0.5$ ) or in non-responders (119.2 vs. 109.3 pg/ml,  $p=0.2$ ). sST2 levels increased between D0 and D7 in the SAH group from 415,062 to 656,775 pg/ml,  $p<0.0001$ . Such increase was observed in both groups of responders and non-responders (respectively 336,775 vs. 589,500,  $p<0.0001$  and 598,788 vs. 761,656,  $p<0.0001$  pg/ml).

#### *sST2 predicts survival in patients with SAH and with cirrhosis*

The overall 2-month survival in SAH and Cirrh patients included in serum analysis of IL-33/ST2 pathway was respectively 76.1% and 65.3%,  $p=0.12$ . Twenty out of the 28 deaths (71.4%) in the SAH group and 6 out of the 8 deaths (75%.) in the Cirrh group were related to infection. In patients with SAH, 2-month survival was higher in those with low concentrations of sST2 (i.e. those with serum sST2 lower than 285,355 pg/ml) according to the percentile



distribution of sST2 at D0 ( $\leq$ 33th percentile, 33-66th percentile and  $\geq$ 66th percentile) than in those with intermediate levels (between 285,355 and 625,756 pg/ml) or high levels of sST2 (above 625,756 pg/ml): 89.5% (79.8-99.2) vs. 79.5% (66.8-92.2) vs. 60% (44.8-64.2) respectively,  $p=0.007$  (Figure 1E).

In order to get more insight on the prognostic performance of sST2 in predicting outcome of patients with SAH, we estimated the effect size of the association between sST2 and outcome by calculating HR per one standard deviation increase and Harrell's c discrimination index. We also drew ROC curves. sST2 was significantly associated with mortality (HR 1.87, 95%CI 1.3-2.67,  $p<0.0001$ ) Area under the ROC curve to predict mortality at 2 months was good: 0.725 (Figure 1F), as well as Harrell's c-index: 0.7,  $p<0.0001$ . sST2 also predicted 2-month mortality in the subgroup of patients with cirrhosis: HR 1.85, 95%CI 1.07-3.21,  $p=0.03$  and area under the ROC curve was at 0.778.

*sST2 levels correlate with endotoxemia and predict the risk of infection in SAH and in cirrhosis.*

In patients with severe alcoholic hepatitis, infection occurred after a median time of 21 (8-39) days following corticosteroid initiation. As expected, quantification of endotoxemia using HPLC-MS/MS showed that patients with SAH had higher levels of 3-HM than patients with cirrhosis and controls: 184.03 vs. 156.5 pmol/ml,  $p=0.05$ , and than controls 184.03 vs. 87.8 pmol/ml,  $p<0.0001$  (Figure 2A).

Importantly, the probability of developing infection at 2 months increased along with the level of sST2 according to the percentile distribution of sST2 at D0 in SAH: 7.7% in low level vs. 30% in intermediate level ( $p=0.01$ ) vs. 57.7% in high level  $p<0.0001$ . The probability of

developing an infection was different in intermediate and high levels of sST2 ( $p=0.01$ ). (Figure 2B). A good performance of sST2 was also found to predict death or infection at 2 months (composite endpoint): HR 1.89, 95%CI 1.46-2.44,  $p<0.0001$ . Subsequent area under the ROC curve was at 0.782 (Figure 2C) and Harrell's c-index was 0.72,  $p<0.0001$ . Finally, when considering the high probability of death in the group of patients with SAH, we determined the Harrell's c-index to predict infection at 2 months, taking death as a competitive event. Performance of sST2 was confirmed with a c-index at 0.73,  $p<0.0001$ . Interestingly, the prognostic value of sST2 to predict death or infection (composite endpoint) was confirmed in the subgroup of patients with cirrhosis: HR 1.66, 95%CI 1.02-2.71,  $p=0.04$  and area under the ROC curve was 0.784.

#### *Correlation between sST2, endotoxemia and liver function*

We found a weak but significant correlation between sST2 levels and MELD score on the overall cohort of patients with cirrhosis and SAH: Spearman's  $r=0.43$ ,  $p<0.0001$ . This weak correlation was confirmed in the subgroup of patients with SAH: Spearman's  $r=0.397$ ,  $p<0.0001$ . Endotoxemia assessed by serum 3-HM measurement was also weakly associated with sST2 levels on the overall cohort of patients with cirrhosis and SAH: Spearman's  $r=0.335$ ,  $p<0.0001$ . The weak correlation between sST2 and endotoxemia was confirmed in the subgroup of patients with SAH: Spearman's  $r=0.331$ ,  $p=0.0006$ .

#### *Downstream effectors of IL-33/ST2 (GRK2 and CXCR2) are affected in SAH and their expression is targeted by IL-33 challenge*

The kinase GRK2 is a negative regulator of membranous CXCR2 expression and its activity is decreased by the IL-33/ST2 pathway. Immunocytochemistry staining showed increased

expression at baseline of GRK2 in circulating PMNs of SAH patients compared to patients with cirrhosis ( $p=0.001$ ) and in patients with cirrhosis compared to controls ( $p=0.04$ ): MIRU at 19527 vs. 12415 vs. 8887. In the presence of IL-33, PMNs showed a marked decreased GRK2 expression (MIRU) in patients with SAH or with cirrhosis respectively from 19527 to 14500,  $p=0.009$  and from 12415 to 9744,  $p=0.06$ , but not in controls: from 8887 to 9632,  $p=0.2$  (Figure 3A and 3B).

We then evaluated the expression of the chemokine receptor CXCR2 on the surface of circulating PMNs. CXCR2 is known to be down-regulated by GRK2. Consistent with data on GRK2, CXCR2 expression was decreased in the SAH (mean fluorescence index 33.1) and Cirrh (49.6) groups compared to Ctrl (109.3)  $p<0.0001$  (Figure 3B). The difference between Cirrh and SAH was also significant ( $p=0.01$ ). Although there was no effect in Ctrl (109.3 vs 106.3,  $p=0.87$ ), treatment with IL-33 partially restored CXCR2 expression in the SAH (33.1 vs 50.8,  $p<0.001$ ) and Cirrh (49.6 vs. 66.5,  $p=0.007$ ) groups (Figure 3C). These results show that CXCR2 expression, a key receptor for neutrophil migration, is down-regulated in advanced stages of ALD, especially in SAH. A challenge with IL-33 can restore its expression by decreasing GRK2 activity.

SIGIRR expression using the FACS analysis was not different between the three groups of patients Ctrl, Cirrh and SAH with respectively (MFI) 0.97 vs. 0.99 vs. 1.07  $p=0.8$ . SIGIRR expression was also not modified by IL-33 challenge (Supplementary Figure 2).

Of note, we did not observe any significant apoptosis upon IL-33 in any group of patients (controls, patients with cirrhosis or with SAH): 0.6% vs. 0.79%,  $p=0.6$  in Ctrl (N=4), 1.01% vs. 1.49%,  $p=0.11$  in Cirrh (N=6) and 0.98% vs. 0.83%,  $p=0.5$  in SAH (N=5).

## Defective PMN migration in SAH: improvement by IL-33

### *Phagocytosis capacity*

The phagocytosis capacity of circulating PMNs was evaluated in Ctrl, Cirrh and SAH patients by a well-validated test (i.e. Phagotest). No difference was observed in the phagocytosis capacity among the three groups, as assessed as mean fluorescence intensity (MFI of 63.7, 67.5, and 70.1 respectively,  $p=0.8$ ). IL-33 pretreatment did not change significantly the phagocytosis capacity in the three groups (Figure 4A).

### Migration capacity

The migration capacity of PMNs driven by IL-8 was assessed using transwell assay experiments, in the presence or absence of IL-33. Spontaneous migration (in the absence of cytokines) was low at baseline and no difference was observed between the SAH, Cirrh and Ctrl groups: 0.14%, 0.15%, 0.17%, respectively ( $p=0.52$ ) (Figure 4B). Treatment with IL-8 increased the percentage of migrating PMNs across the three groups, but the effect of IL-8 was less marked in the SAH group (3.7%,  $p=0.0001$ ) than in Cirrh (7.3%,  $p=0.0003$ ) or Ctrl (12.2%,  $p=0.04$ ) (Figure 4B).

Treatment with IL-33 had no effect on the percentage of migrating cells in controls (12.2% vs. 13.1%,  $p=0.7$ ). In contrast, the percentage of migrating PMNs increased in SAH and Cirrh compared to IL-8 alone, showing partial restoration of the migration defect: SAH (3.7% vs 4.7%,  $p=0.0009$ ) and Cirrh (7.3% vs. 8.7%,  $p=0.006$ ) (Figure 4B).

We finally analyzed the impact of response to treatment on the changes in PMN migration between the initiation of prednisolone (D0) and day 7 of therapy (D7) in SAH. IL-8 increased the percentage of migrating PMNs on D0 in responders (i.e. Lille  $<0.45$ ): 0.19% vs. 4.02%,  $p=0.002$ . This effect was further improved by IL-33: 4.02% vs. 8.33%,  $p=0.006$ . Similarly, in non-responders, IL-8 increased the percentage of migrating PMNs on D0 compared to

baseline (0.13% vs. 2.08%,  $p=0.03$ ) and the addition of IL-33 further increased this percentage (2.08% vs. 3.31%,  $p=0.07$ ). The percentage of migrated cells at D0 following treatment with IL-8 was similar in responders and non-responders ( $p=0.3$ ) but IL-33 induced greater migration of PMNs in responders than in non-responders ( $p=0.05$ ) (figure 5A).

This difference in migration between responders and non-responders was greater after seven days of treatment with steroids. Indeed, at D7, treatment with IL-8 increased the percentage of migrating PMNs (0.11% vs. 4.93%,  $p=0.0003$ ) in responders and this percentage increased again with the addition of IL-33 (4.93% vs. 11.22%  $p=0.0005$ ). At D7, IL-8 and IL-33 also increased PMN migration in non-responders: (addition of IL-8: 0.08% vs. 1.51%,  $p=0.03$ ; addition of IL-33: 1.51% vs. 3.8%,  $p=0.005$ ). After 7 days of steroids, the difference became significant between responders and non-responders after challenge with IL-8 (4.93% vs. 1.51%,  $p=0.04$ ). Furthermore, treatment with IL-33 was more effective in PMN from responders than in those from non-responders (11.22% vs. 3.8%,  $p=0.005$ ) (Figure 5B). In order to assess if larger amount of IL-33 could overcome the less good response to IL-33 in non-responders, we performed migration assays with increased doses of IL-33 (50, 200, 500 and 1000 ng/ml) in both responders and non-responders at baseline and after 7 days of prednisolone course. There was no improvement in migration capacity in both groups with the increased doses as compared to the standard dose of 50 ng/ml (data not shown).

## *Discussion*

Alcoholic hepatitis is associated with a high incidence of infection, a major driver of short-term mortality. While several pathways have been investigated in decompensated cirrhosis<sup>9</sup> there are fewer data in alcoholic hepatitis. This study shows that the IL-33/ST2 pathway is altered in PMNs from patients with SAH and that this defect can be restored, at least in part, by IL-33. Indeed, the levels of circulating sST2, a biomarker indicative of the IL-33/ST2 pathway activity, are associated with short-term mortality, development of infection and response to steroids. We also observed that different downstream effectors of IL33/ST2 pathway were altered in SAH. Indeed, SAH is associated with an increased expression of GRK2 and decreased expression of CXCR2, which can be restored by challenging PMNs with IL-33. The decreased CXCR2 expression can be linked to a reduced migration capacity induced by IL-8, which can be improved by challenge with IL-33. Main study findings are shown in Figure 6.

The issue of controls is critical in translational research for alcoholic hepatitis. Indeed, most patients admitted with severe alcoholic hepatitis (i.e. with a Maddrey discriminant function >32) have underlying cirrhosis. Thus, we used two different control groups (i.e. patients with cirrhosis and healthy controls) to prove that changes in the IL-33/ST2 pathway in SAH are related to alcoholic hepatitis rather than decompensated cirrhosis. Comparison between cirrhosis and controls also shows the defect in this pathway during liver decompensation without any inflammatory process.

Endotoxemia was quantified using the HPLC-MS/MS (high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry) method to determine serum concentrations of 3-hydroxymyristate (3-HM). We chose this technique because HPLC-MS/MS can more accurately identify patients with low-grade endotoxemia, as compared to the classical LAL (limulus amoebocyte lysate) test, due to its high specificity and low limits of detection and

quantification. Moreover, the measurement is not affected by the lipid content of samples, thus avoiding bias due to lipid-rich particles observed with the LAL test<sup>23</sup>. Such technique has been validated in patients with cirrhosis<sup>22</sup>.

We confirm here that patients with SAH have higher endotoxemia than patients with cirrhosis and controls<sup>30</sup>. The weak although significant correlation between sST2 levels and MELD score or endotoxemia suggests that liver failure and latent infection do not play an exclusive role to drive sST2 up in patients with SAH. As compared to the study by Alves-Filho et al.<sup>20</sup> we think that it is not only infection or liver insufficiency that inhibits the IL33-ST2 pathway but rather that this defect is a characteristic of SAH. Future studies are required to determine if systemic inflammation associated with SAH plays a role in the defect in the IL-33/ST2 pathway.

SIGIRR has been suggested to be a downregulator of the TLR pathways implicated in sepsis in murine models, especially in neutrophils, with conflicting results in terms of functional consequences<sup>31,32</sup>. In the present study, we did not observe any significant difference in SIGIRR expression between controls, patients with cirrhosis and with SAH, in the presence or the absence of IL-33

Because the incidence of infection is a major driver of mortality in severe alcoholic hepatitis<sup>5,8,33</sup>, there is a urgent need of reliable markers able to identify patients at a greater risk of becoming infected. Although baseline severity scores have been combined with scores evaluating medical management response, the percentage of well-classified patients is still around 80%. Thus, the outcome of some patients is not properly predicted in close to 20% of cases. Moreover, in patients initially classified as having good prognosis and who respond to therapy, the occurrence of an infection is responsible for a major drop in survival<sup>8</sup>. Circulating sST2 has been proposed as a biomarker in several diseases<sup>34-36</sup> and adding this marker to available scoring systems could optimize the prediction of clinical events in SAH. We show

here using a large sample size and a robust methodology that sST2 not only predicts mortality but also the probability of getting infected in SAH and in cirrhosis, even though circulating levels of sST2 are different between the two conditions. Such results are promising because there is a large unmet need for biomarkers to predict the development of infection in both SAH and cirrhosis. Since elevated baseline sST2 values are associated with the risk of development of infection after treatment, patients with high sST2 might be candidates for trials testing strategies against infection. We observed higher levels of sST2 after 7 days of prednisolone exposure in both responders and non-responders to corticosteroids. It has already been reported that sST2 levels are increased by steroid treatment in ulcerative colitis and in systemic lupus erythematosus<sup>37-39</sup> and we feel that its evolution under prednisolone is not indicative of the global activity of the IL-33/ST2 pathway.

There has been no significant improvement in the pharmaceutical management of SAH in the past few years. Based on the knowledge that infection is associated with a high short-term probability of death, results in trials testing antibiotic prophylaxis are expected (Rifaximin: NCT02116556; Ciprofloxacin: NCT02326103; Amoxicillin and Clavulanate: NCT02281929). While strategies with antibiotics are promising, they do not restore the immune defect associated with SAH. Stimulating PMN migration to the site of infection with IL-33 might represent an appealing option. Indeed, alterations in migration capacity have been associated with an increased risk of infection in humans<sup>40</sup>. Interestingly an increased migration capacity of circulating PMNs with IL-33 was found in both responders and non-responders to treatment in patients with SAH. We previously showed that non-responders to steroids are more likely to develop infection than responders<sup>8</sup>. The present study shows that PMNs from non-responders have a lower migration capacity following a challenge with IL-8 than those from responders and that IL-33 leads to an improvement in migration capacity in both groups. Although PMNs from non-responders are less responsive to IL-33, this cytokine



improves migration capacity. This is particularly important because of the high rate of infection in these patients. Furthermore, PMNs from non-responders are less responsive to IL-33 at D0, suggesting that the defect in migration in these patients is already present in part before steroid exposure. The defect in IL-33/ST2 pathway in the neutrophils of non-responders to corticosteroids seems to be related to higher levels of the decoy receptor sST2 but also to a less good response to IL-33 than responders that cannot be improved with higher doses of IL-33.

While neutrophils were treated with a dose of 50 ng/ml in the ex vivo experiments, the detected dose in the serum was around 100 pg/ml. Such a difference can be viewed as a supraphysiological stimulus. Other authors have also used similar doses<sup>20,41-44</sup>. In addition, we cannot exclude that the detection of IL-33 in the serum of patients lacks sensitivity. Based on our results, we propose that in patients with SAH, restoration of IL-33/ST2 pathway may help prevent and treat infection in both responders and non-responders.

In the present study, the IL-33/ST2 pathway did not modulate the phagocytic capacity of circulating PMNs suggesting that this pathway only improves PMNs influx at the site of infection. We would like to underline that impairment in neutrophil function during ALD is not restricted to decreased phagocytosis but also includes defect in microbial killing with several pathways involved such as myeloperoxidase, TIM-3, PD-1, etc.<sup>9</sup> Thus, future studies targeting pathways involved in phagocytic capacity in circulating PMNs are needed.

Alcoholic hepatitis is a complex disease and the role of PMNs is not fully understood. Indeed, there is a paradox between the liver infiltrate by neutrophils (suggesting that activation of these cells are harmful to the liver) and a defect in neutrophil migration capacity (suggesting that a defect in PMN function is harmful to infection). In addition, IL-8 is the most upregulated cytokine in patients with acute drinking/alcoholic hepatitis vs. patients without SAH in the CANONIC study evaluating the profile of patients with acute-on-chronic liver

failure<sup>45</sup>. IL-8 is also elevated in the blood and in the liver of patients with SAH in the study by Taïeb et al.<sup>46</sup>. Based on our results on neutrophil migration upon IL-8 and IL-33, we cannot exclude that promoting IL-33/ST2 pathway in patients with ALD could result in a higher recruitment of neutrophils in the liver. Although the present study does not address this issue, it can be hypothesized that neutrophil migration triggers are different for the liver and the site of infection. The discrepancies between migration in the liver and to the site of infection could be related to different patterns of chemokine expression. However, IL-8 is not the only signal leading to neutrophil recruitment, as reviewed by Gustot et al.<sup>9</sup> Specific studies testing chemotaxis targets are needed for alcoholic hepatitis.

In conclusion, this study shows that circulating neutrophil migration is altered in severe alcoholic hepatitis and that this defect is reversible by restoring the IL-33/ST2 pathway. Circulating sST2 levels are associated with survival and the probability of infection. Our results suggest that treatment with IL-33 represents a new potential therapeutic strategy in severe alcoholic hepatitis to decrease the risk of infection.

## References

1. Maddrey WC, Boitnott JK, Bedine MS, et al. Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1978;75:193–199.
2. Mathurin P, Louvet A, Duhamel A, et al. Prednisolone with vs without pentoxifylline and survival of patients with severe alcoholic hepatitis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2013;310:1033–1041.
3. Lucey MR, Schaubel DE, Guidinger MK, et al. Effect of alcoholic liver disease and hepatitis C infection on waiting list and posttransplant mortality and transplant survival benefit. *Hepatology* 2009;50:400–406.
4. Mathurin P, O’Grady J, Carithers RL, et al. Corticosteroids improve short-term survival in patients with severe alcoholic hepatitis: meta-analysis of individual patient data. *Gut* 2011;60:255–260.
5. Thursz MR, Richardson P, Allison M, et al. Prednisolone or pentoxifylline for alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 2015;372:1619–1628.
6. Louvet A, Thursz MR, Kim DJ, et al. Corticosteroids Reduce Risk of Death Within 28 Days for Patients With Severe Alcoholic Hepatitis, Compared With Pentoxifylline or Placebo—a Meta-analysis of Individual Data From Controlled Trials. *Gastroenterology* 2018;155:458–468.e8.
7. Louvet A, Naveau S, Abdelnour M, et al. The Lille model: a new tool for therapeutic strategy in patients with severe alcoholic hepatitis treated with steroids. *Hepatology* 2007;45:1348–1354.
8. Louvet A, Wartel F, Castel H, et al. Infection in patients with severe alcoholic hepatitis treated with steroids: early response to therapy is the key factor. *Gastroenterology* 2009;137:541–548.
9. Gustot T, Fernandez J, Szabo G, et al. Sepsis in alcohol-related liver disease. *J Hepatology* 2017;67:1031–1050.
10. Mookerjee RP, Stadlbauer V, Lidder S, et al. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *Hepatology* 2007;46:831–840.
11. Stadlbauer V, Mookerjee RP, Wright GA, et al. Role of Toll-like receptors 2, 4, and 9 in mediating neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G15–22.
12. Boussif A, Rolas L, Weiss E, et al. Impaired intracellular signaling, myeloperoxidase release and bactericidal activity of neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis. *J Hepatology* 2016;64:1041–1048.
13. Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, et al. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *J Infect Dis* 2000;182:526–533.

14. Mousson C, Ortega N, Girard J-P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel “alarmin”? *PloS One* 2008;3:e3331.
15. Hudson CA, Christophi GP, Gruber RC, et al. Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia. *J Leukoc Biol* 2008;84:631–643.
16. Préfontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, et al. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 2009;183:5094–5103.
17. Arshad MI, Piquet-Pellorce C, L’Helgoualc’h A, et al. TRAIL but not FasL and TNF $\alpha$ , regulates IL-33 expression in murine hepatocytes during acute hepatitis. *Hepato* Baltim Md 2012;56:2353–2362.
18. Wang M, Shen G, Xu L, et al. IL-1 receptor like 1 protects against alcoholic liver injury by limiting NF- $\kappa$ B activation in hepatic macrophages. *J Hepato* 2017.
19. Sun Z, Chang B, Gao M, et al. IL-33-ST2 Axis in Liver Disease: Progression and Challenge. *Mediators Inflamm* 2017;2017:5314213.
20. Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med* 2010;16:708–712.
21. Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 2009;360:2758–2769.
22. Weil D, Pais de Barros J-P, Mourey G, et al. Circulating levels of 3-hydroxymyristate, a direct quantification of endotoxaemia in noninfected cirrhotic patients. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver* 2019;39:106–114.
23. Pais de Barros J-P, Gautier T, Sali W, et al. Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amoebocyte lysate assay. *J Lipid Res* 2015;56:1363–1369.
24. Jensen EC. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. *Anat Rec Hoboken NJ* 2007 2013;296:378–381.
25. Sebastiani S, Allavena P, Albanesi C, et al. Chemokine receptor expression and function in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes with regulatory activity. *J Immunol Baltim Md* 1950 2001;166:996–1002.
26. Traidl-Hoffmann C, Kasche A, Jakob T, et al. Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:831–838.
27. Pionnier N, Brotin E, Karadjian G, et al. Neutropenic Mice Provide Insight into the Role of Skin-Infiltrating Neutrophils in the Host Protective Immunity against Filarial Infective Larvae. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0004605.
28. Portney L, Watkins M. *Foundations of Clinical Research: Applications to Practice* 2nd Edition. 2000.
29. Wolbers M, Koller M, Witteman J, et al. Prognostic models with competing risks.

Methods and application to coronary risk prediction.

30. Michelena J, Altamirano J, Abalde JG, et al. Systemic inflammatory response and serum lipopolysaccharide levels predict multiple organ failure and death in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2015;62:762–772.
31. Ueno-Shuto K, Kato K, Tasaki Y, et al. Lipopolysaccharide decreases single immunoglobulin interleukin-1 receptor-related molecule (SIGIRR) expression by suppressing specificity protein 1 (Sp1) via the Toll-like receptor 4 (TLR4)-p38 pathway in monocytes and neutrophils. *J Biol Chem* 2014;289:18097–18109.
32. Blok DC, Lieshout MHP van, Hoogendijk AJ, et al. Single immunoglobulin interleukin-1 receptor-related molecule impairs host defense during pneumonia and sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Innate Immun* 2014;6:542–552.
33. Vergis N, Atkinson SR, Knapp S, et al. In Patients With Severe Alcoholic Hepatitis, Prednisolone Increases Susceptibility to Infection and Infection-Related Mortality, and Is Associated With High Circulating Levels of Bacterial DNA. *Gastroenterology* 2017;152:1068-1077.e4.
34. Coronado MJ, Bruno KA, Blauwet LA, et al. Elevated Serum sST 2 Is Associated With Heart Failure in Men  $\leq 50$  Years Old With Myocarditis. *J Am Heart Assoc* 2019;8:e008968.
35. Alam ML, Katz R, Bellovich KA, et al. Soluble ST2 and Galectin-3 and Progression of CKD. *Kidney Int Rep* 2019;4:103–111.
36. Watanabe M, Nakamoto K, Inui T, et al. Serum sST2 levels predict severe exacerbation of asthma. *Respir Res* 2018;19:169.
37. Díaz-Jiménez D, Núñez L, De la Fuente M, et al. A functional IL1RL1 variant regulates corticosteroid-induced sST2 expression in ulcerative colitis. *Sci Rep* 2017;7:10180.
38. Díaz-Jiménez D, Núñez LE, Beltrán CJ, et al. Soluble ST2: a new and promising activity marker in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2011;17:2181–2190.
39. Mok MY, Huang FP, Ip WK, et al. Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Oxf Engl* 2010;49:520–527.
40. Egger G, Aigner R, Glasner A, et al. Blood polymorphonuclear leukocyte migration as a predictive marker for infections in severe trauma: comparison with various inflammation parameters. *Intensive Care Med* 2004;30:331–334.
41. Bandara G, Beaven MA, Olivera A, et al. Activated mast cells synthesize and release soluble ST2—a decoy receptor for IL-33. *Eur J Immunol* 2015;45:3034–3044.
42. Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, et al. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem* 2007;282:26369–26380.
43. Le HT, Tran VG, Kim W, et al. IL-33 priming regulates multiple steps of the neutrophil-mediated anti-*Candida albicans* response by modulating TLR and dectin-1 signals. *J Immunol Baltim Md* 1950 2012;189:287–295.
44. Lan F, Yuan B, Liu T, et al. Interleukin-33 facilitates neutrophil recruitment and

bacterial clearance in *S. aureus*-caused peritonitis. *Mol Immunol* 2016;72:74–80.

45. Clària J, Stauber RE, Coenraad MJ, et al. Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: Characterization and role in acute-on-chronic liver failure. *Hepatology* 2016;64:1249–1264.

46. Taïeb J, Mathurin P, Elbim C, et al. Blood neutrophil functions and cytokine release in severe alcoholic hepatitis: effect of corticosteroids. *J Hepatol* 2000;32:579–586.

**Table 1. Baseline characteristics of patients with severe alcoholic hepatitis and cirrhosis included in prognostic analyses.** Characteristics detailed below are that of patients included in the serum analyses (IL-33, sST2 and 3-HM) performed to determine the relationship between the IL33-ST2 pathway with prognosis and infection. Data are presented in medians with interquartile range.

	<i>SAH</i>	<i>Cirrh</i>	<i>P</i>
<b>Number</b>	119	24	
<b>Male/Female, N (%)</b>	82/37 (68.9/31.1)	19/5 (79.2/27.8)	0.3
<b>Age, years</b>	50.4 (41.8-58.1)	60.5 (52.7-66.9)	0.0001
<b>Ascites, N (%)</b>	71 (59.7)	21 (87.5)	0.05
<b>Hepatic encephalopathy, N (%)</b>	19 (16.2)	10 (41.6)	0.01
<b>Leukocytes, G/L</b>	11.2 (8.6-14.5)	9.1 (6.1-11.7)	0.09
<b>CRP, mg/L</b>	28.5 (20.5-43)	13.5 (6-17.3)	0.03
<b>Albumin, g/L</b>	27 (24-31)	33.5 (30.5-38.7)	0.002
<b>Bilirubin, mg/dL</b>	17 (11.3-26.9)	4.4 (1.7-6.6)	<0.0001
<b>Creatinine, mg/dL</b>	0.8 (0.6-1.1)	1.4 (1-1.5)	0.001
<b>Prothrombin rate, %</b>	40 (33-51)	47 (34-60)	0.06
<b>MELD score</b>	25 (22-31)	19 (16-23)	0.001
<b>Child-Pugh score</b>	11 (9-12)	9 (7-11)	0.01
<b>Lille Model</b>	0.25 (0.08-0.58)	NA	
<b>Responders according to 0.45, N (%)</b>	75 (63)	NA	
<b>2-month survival, %</b>	75.5 (67.3-83.7)	65.3 (45.8-84.8)	0.12

## Legend of figures

**Figure 1. IL-33/ST2 pathway expression and association with survival.** (A and B) Serum level of IL-33 (A) and sST2 (B) from healthy controls (Ctrl, N=12), cirrhotic patients (Cirrh, N=24) and patients with severe alcoholic hepatitis (SAH, N=119). Results are expressed in median in pg/ml with interquartile range (IQR). (C and D) IL-33/ST2 pathway expression according to response to medical treatment assessed by the Lille score with responders (N=75) defined by a score <0.45 and non-responders (N=44) by a score  $\geq$ 0.45. (E) 2-month survival according to percentile distribution ( $\leq$ 33<sup>th</sup> (N=39), between 33<sup>th</sup> and 66<sup>th</sup> (N=40),  $\geq$ 66<sup>th</sup> (N=40)) level of sST2 at D0 in SAH patients. (F) ROC curve in binormal representation of sST2 to prediction 2-month survival in patients with SAH (N=119).

**Figure 2. sST2, endotoxemia and infection risk** (A) Levels of circulating 3-HM in the three groups (Ctrl N=12, Cirrh N=24, SAH N=119). Results are expressed in pmol/ml. (B) Percentage of patients with SAH developing infection after initiation of medical treatment according the percentile distribution of sST2 at baseline (C) ROC curve in binormal representation of the capacity of sST2 to predict 2-month infection-free survival in patients with SAH (N=119).

**Figure 3. Expression of molecular effectors of the IL33/sST2 pathway in circulating PMNs.** (A) Expression of molecular drivers of the IL33-sST2 pathway in circulating PMNs. Representative immunocytochemistry staining (x200) of intracytoplasmic GRK2 expression in Ctrl, Cirrh and SAH PMNs with and without pretreatment by IL-33. A picture showing the cytosolic staining of GRK2 in a SAH patient is provided at a greater magnitude (x400). (B) Quantification of immunocytochemistry staining expressed in MIRU in the three groups (Ctrl N=7, Cirrh N=8, SAH N=7). (C) CXCR2 expression by FACS. Expression of transmembranous chimiokine receptor CXCR2 on circulating PMNs of Ctrl (N=10), Cirrh (N=15) and SAH (N=22) with or without pretreatment by IL-33. Results are expressed in median of MFI with IQR.

**Figure 4. Evaluation of migration function and phagocytosis of circulating PMNs during ALD.** (A) Migration capacity of circulating PMNs of Ctrl (N=10), Cirrh (N=15) and SAH (N=22) patients has been evaluated by transwell assays in the presence or absence of IL-33. Results are expressed by median percentage (and IQR) of migrated cells after standard deposition in the upper well of  $1.10^6$  cells. (B) Phagocytosis capacity evaluated by standard test with FACS. Results are expressed of median in mean fluorescence intensity with IQR in Ctrl (N=3), Cirrh (N=10) and SAH (N=3).

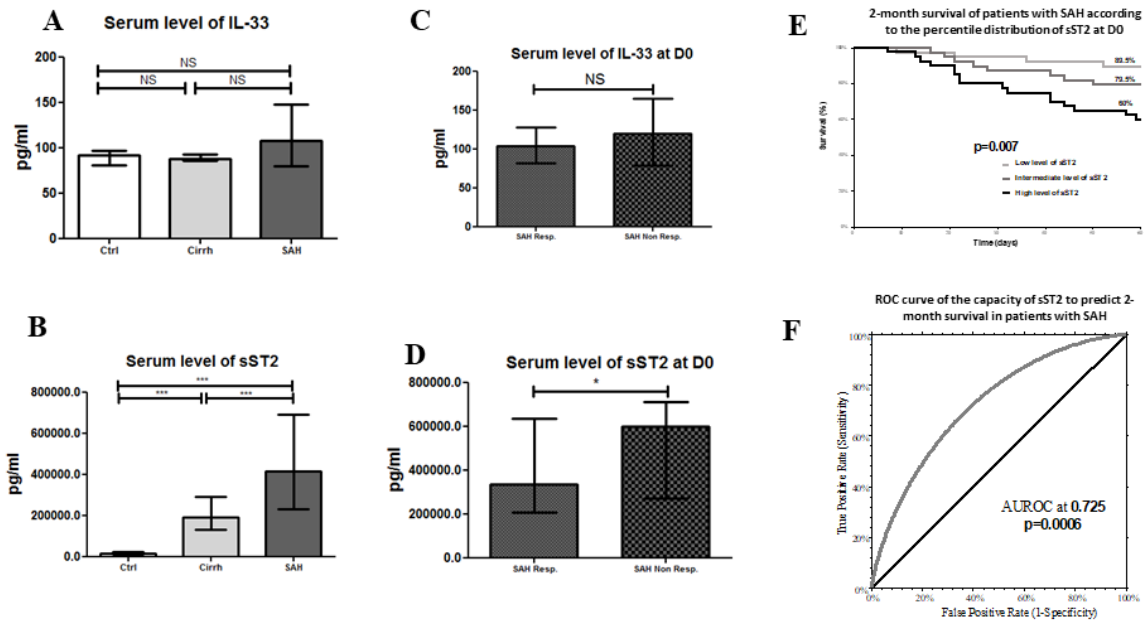
**Figure 5. Evaluation of migration capacity of PMNs in SAH according to response to treatment.** Migration capacity of circulating PMNs of patients with SAH (N=22) has been performed by transwell assays in the presence or absence of IL-33. Results are expressed by



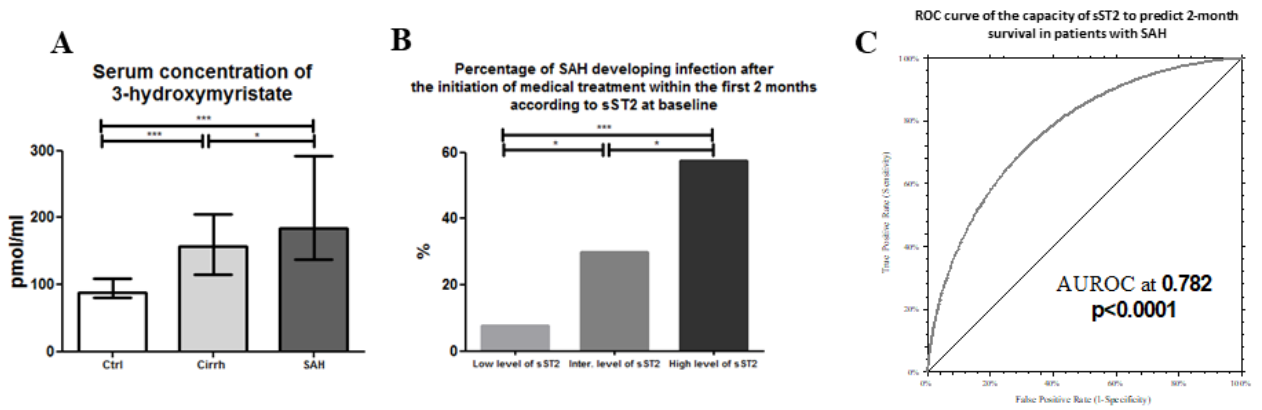
median percentage (and IQR) of migrated cells after standard deposition in the upper well of  $1.10^6$  cells. (A) Evolution of migration capacity of circulating PMNs at D0 according to response to treatment (responders N=11, non-responders N=11). (B) Evolution of migration capacity of circulating PMNs at D7 according to response to treatment.

**Figure 6. Main study findings.**

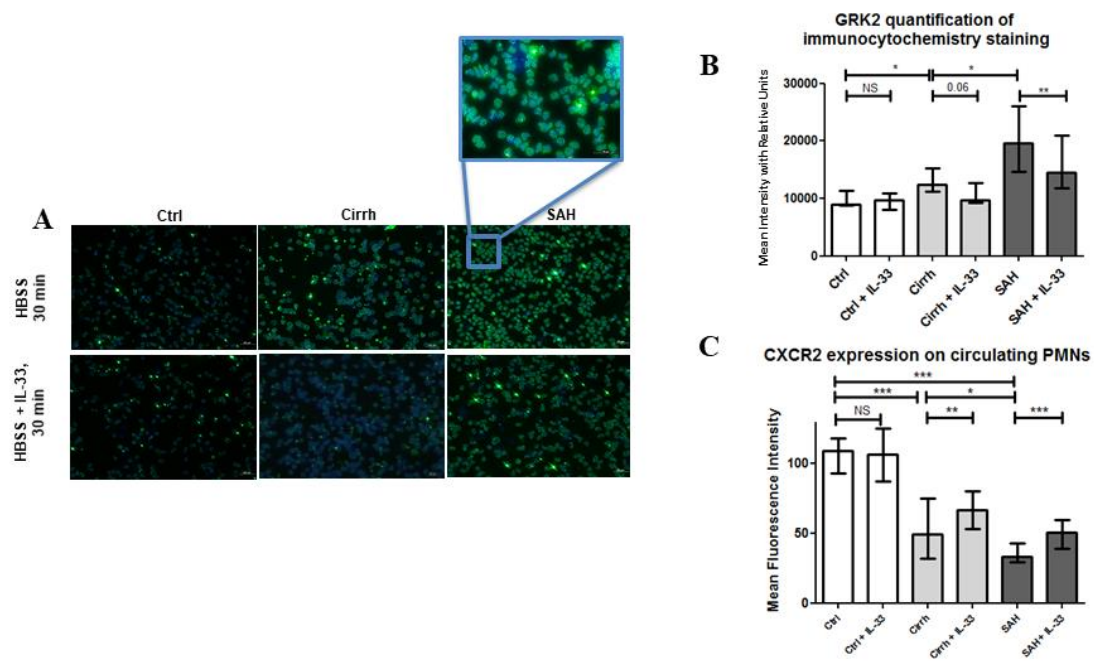
**Figure 1 :**



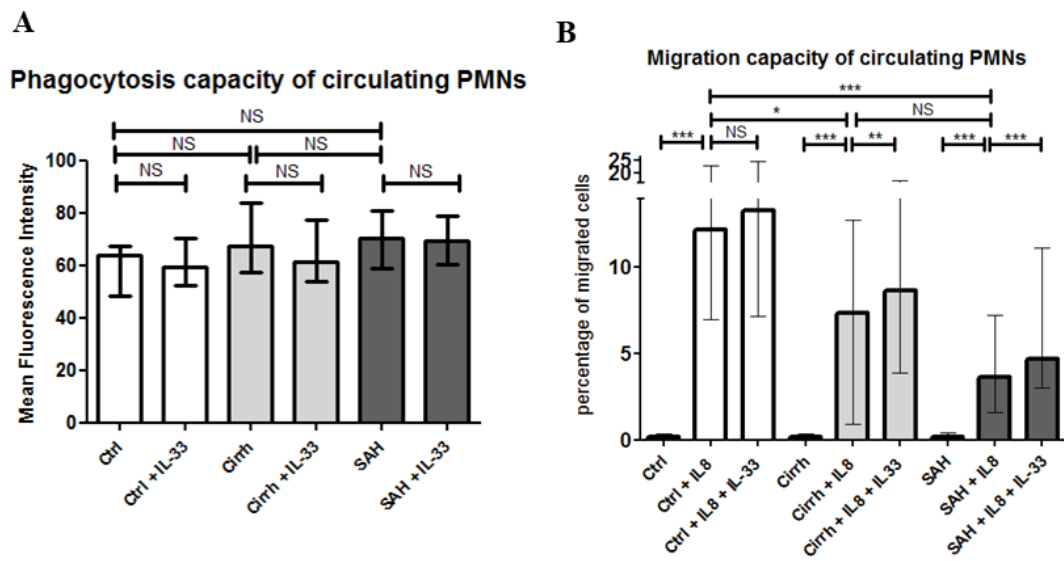
**Figure 2:**



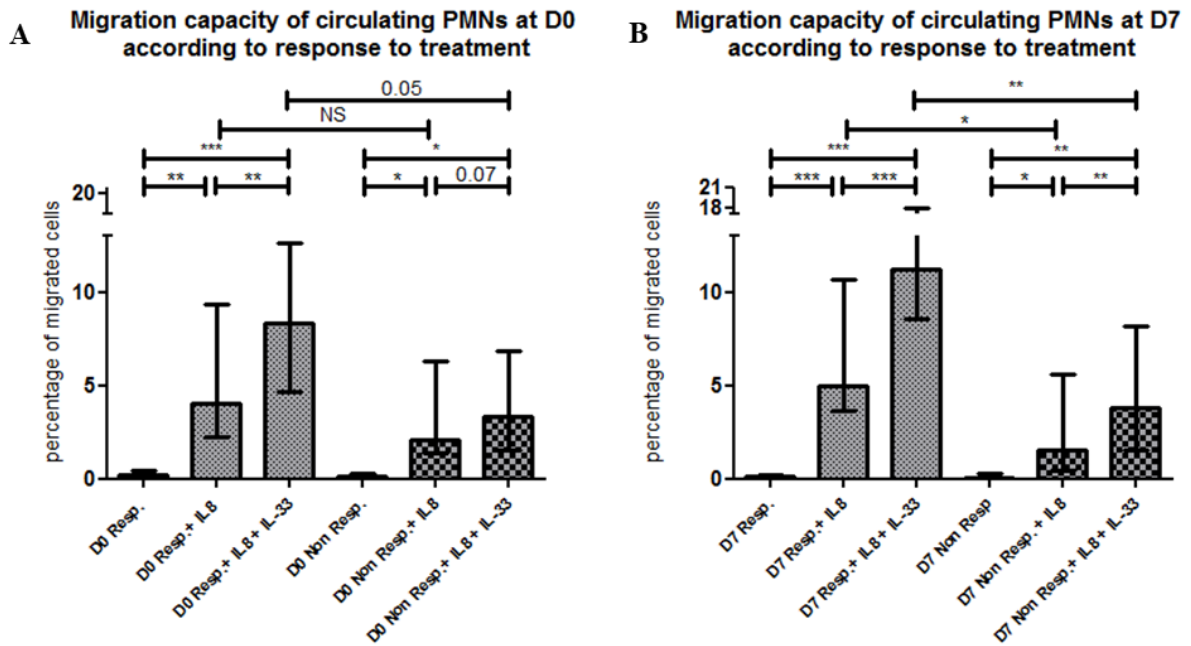
**Figure 3:**



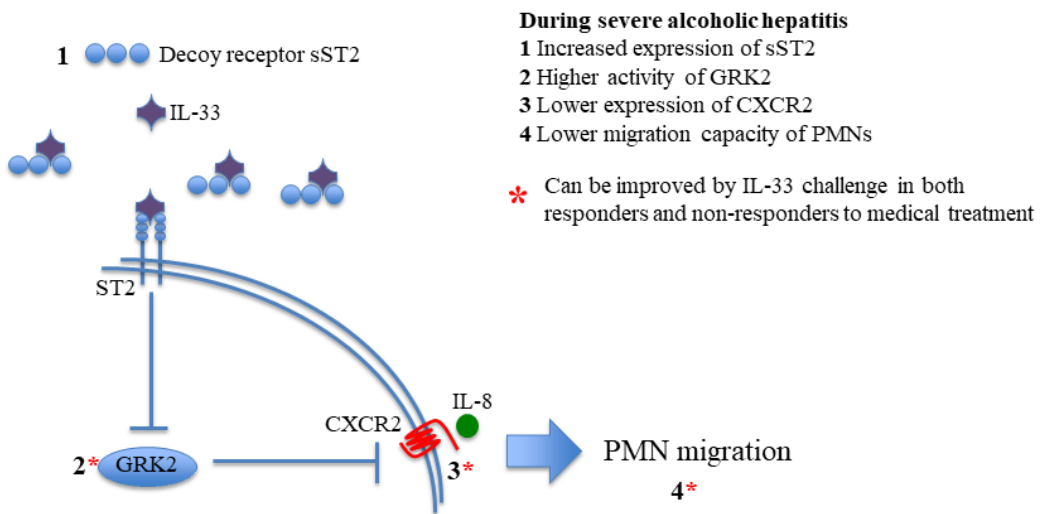
**Figure 4:**



**Figure 5:**



**Figure 6:**



### 3-3- Conclusion générale du manuscrit n°3

Cette étude a permis de mettre en évidence une importante dérégulation de la voie IL33/ST2 ainsi qu'un impact direct sur le pouvoir migratoire du PNN chez les patients atteints d'HA.

Nos datas démontrent une augmentation du taux sérique en sST2, un acteur principal et un biomarqueur indiquant l'activité de la voie IL33/ST2. Cette augmentation en sST2 est associée à la mortalité à court terme, au développement de l'infection et à la réponse aux stéroïdes.

Nous avons également observé que différents effecteurs en aval de la voie IL33 / ST2 étaient altérés dans l'HA. En effet, le marquage immunocytochimique de la kinase GRK2 semblait être plus important dans les PNN des patients HA comparé aux patients contrôles et aux patients cirrhotiques décompensés. L'expression accrue de GRK2 dans les PNN des patients HA était en corrélation avec un déficit de signalisation induite par le rétrocontrôle négatif de GRK2 sur l'expression de CXCR2. Cependant, nous avons montré que le traitement des PNN avec de l'IL33 était capable de contrebalancer cet effet en diminuant l'expression de GRK2 et en restaurant partiellement l'expression de CXCR2.

D'une façon paradoxale, l'HA est caractérisé par une importante infiltration de PNN dans le parenchyme hépatique, alors que nous avons montré dans cette étude que la fonction migratoire du PNN des patients HA était complètement altérée par rapport aux patients contrôles et cirrhotiques décompensés. Probablement due au déficit en CXCR2, la migration réduite des PNN des patients HA en réponse à de l'IL8 était en partie restaurée grâce au traitement de ces derniers par de l'IL33.

D'un autre côté, nous n'avons pas mis en évidence l'implication de la voie IL33 dans les autres fonctions du neutrophile notamment au niveau des tests de phagocytose

(phagostest) et du « burst » oxydatif (phagoburst). Contrairement aux données de la littérature montrant un défaut fonctionnel des PNN au niveau de leurs pouvoirs phagocytaires, nos résultats n'ont pas permis de reproduire ces données de la littérature. Nous ne montrons pas de défaillance de ce processus avec les PNN des patients HA ayant acceptés d'entrer dans l'étude.

En conclusion, cette étude montre que la migration des neutrophiles circulants est altérée au cours de l'HA sévère, et que ce défaut est, au moins en partie, réversible en restaurant la voie IL-33/ST2.

Les taux du récepteur ST2 circulant sont associés à la survie et à la probabilité d'infection. Nos résultats suggèrent que le traitement à l'IL-33 représente une nouvelle stratégie thérapeutique potentielle dans le traitement de l'hépatite alcoolique sévère afin de réduire le risque d'infection.

# **Discussion générale**

L'hépatite alcoolique a longtemps été décrite dans la littérature comme étant la cause d'un processus inflammatoire à l'origine de la pathologie. Le traitement unique proposé est limité aux stéroïdes pour calmer cette inflammation. Cependant, 40% des patients ne répondent pas au traitement, et décèdent dans les mois qui suivent leur hospitalisation en cas d'une absence de transplantation hépatique.

L'étude de cette pathologie s'avère compliquée à cause du manque du matériel biologique limité à quelques millimètres de biopsie transjugulaire. Cela ne permet pas de approfondir la compréhension des mécanismes sous-jacents à la pathologie. D'un autre côté, même si les modèles murins ont permis d'avancer dans la compréhension de la maladie alcoolique du foie, ils sont incapables de reproduire le spectre complet de la physiopathologie de l'HA.

Notre équipe, grâce à des prélèvements rares et précieux provenant d'explants de patients transplantés pour des hépatites alcooliques ou des cirrhoses alcooliques, a mis en évidence l'implication d'un processus tout aussi important que l'inflammation : la régénération hépatique. En effet, nous avons démontré un déficit de régénération hépatique chez les patients HA caractérisé par une altération au niveau de la prolifération hépatocytaire, ainsi qu'une expansion anormale au niveau du parenchyme hépatique de cellules cholangiocytaires.

Dans un état physiologique normal, l'homéostasie hépatique est basée sur un équilibre étroit entre le processus inflammatoire et le processus de régénération. Dans l'HA, cet équilibre est rompu, avec une exacerbation du processus inflammatoire qui a été corrélé à la mortalité chez ces patients, ainsi qu'un dysfonctionnement du processus de régénération avec un déficit d'hépatocytes fonctionnels.



Plusieurs hypothèses ont émergé sur l'origine de cette inflammation chez les patients HA. Parmi eux, la translocation bactérienne du tractus digestif vers le foie à cause de l'alcool et d'autre part, la mort cellulaire, notamment des hépatocytes. Le PNN est un acteur principal dans l'HA, et l'infiltration de ce dernier au niveau du parenchyme hépatique est même utilisée comme critère histologique du diagnostic de cette pathologie. De même une étude récente a montré un dysfonctionnement au niveau de la fonctionnalité du PNN caractérisé par une diminution de sa capacité à phagocyter.

Nos études réalisées ont permis d'identifier NOD1 comme étant un acteur essentiel dans l'interaction du PNN avec l'hépatocyte. L'utilisation du modèle d'ischémie reperfusion pour mimer l'infiltration du PNN et la nécrose hépatocytaire retrouvée dans l'HA, nous a permis de montrer que l'inhibition de NOD1 permet de limiter l'atteinte hépatique. L'expression des molécules d'adhésion ICAM et VCAM par l'hépatocyte est directement liée à l'expression de NOD1 par le biais des voies P38 et ERK. L'analyse microarray de la microdissection laser des hépatocytes d'HA comparé aux patients cirrhotique et contrôle révèle une augmentation de l'expression de NOD1 et d'ICAM. Ces résultats suggèrent une implication du PNN dans la survenue des lésions hépatiques induites dans l'HA.

D'une façon paradoxale, l'étude de la fonctionnalité des PNN dans l'HA a montré une altération dans le processus migratoire du PNN dans l'HA. L'IL33/ST2 est une voie de signalisation qui a été décrite notamment au niveau du sepsis pour être impliquée dans les processus de migration des PNN. Nos analyses réalisées sur une grande cohorte de patients HA démontre une altération au niveau de la voie IL33/ST2. Cette altération est caractérisée notamment par une augmentation des taux du récepteur ST2 sérique des patients HA. Nous avons montré que la migration des PNN était réduite chez les patients HA comparé aux patients cirrhotiques et aux contrôles ; cette altération serait réversible par un traitement des PNN à l'IL33.

Concernant la régénération hépatique, notre étude a permis de mettre en évidence un dysfonctionnement de la voie Hippo/YAP au niveau hépatocytaire des patients HA. Basé sur des données de littérature, la voie Hippo/YAP a été étudiée dans plusieurs modèles transgéniques murins pour déterminer son rôle au niveau de l'hépatocyte. Les données démontrent clairement une implication de cette voie de signalisation dans le devenir des hépatocytes et des HPCs. Dans un contexte physiologique normal, YAP est essentiellement exprimé au niveau des cellules biliaires et HPCs, tandis que son expression au niveau hépatocytaire est faible. L'activation de YAP dans des hépatocytes murins induit leurs dédifférenciations en cellules HPCs et cholangiocytaires. Nous avons démontré pour la première fois dans un contexte de pathologie humaine hors contexte cancéreux, un défaut d'activation de la voie Hippo dans les hépatocytes des patients HA. Les marquages IHC ainsi que les co-marquages démontrent un marquage nucléaire anormal de YAP au niveau des hépatocytes des patients HA. Nous avons mis en évidence une expression et activité anormales de la kinase MST1 chez ces patients qui pourrait expliquer cette activation anormale de YAP. L'expression des marqueurs biliaires précoces HNF1 $\beta$  et SOX9 au niveau des hépatocytes HA démontrent la mise en place d'un programme de dédifférenciation hépatocytaire.

De même, une récente étude a démontré une perte de l'activité transcriptionnelle de HNF4 $\alpha$  et de son expression avec, en contrepartie, une expression accrue de son isoforme fœtale HNF4 $\alpha$ -P2 conduisant ainsi à la perte de la fonction hépatocytaire (Argemi et al., 2019). Cependant, d'autres données de la littérature démontrent chez la souris que l'expression de YAP est capable d'inhiber le programme de différenciation hépatocytaire, induite par HNF4 $\alpha$  et la  $\beta$ -caténine (Fitamant et al., 2015). Cela pourrait expliquer la cause de la perte d'expression de HNF4 $\alpha$  chez les patients HA, et nous réconforter sur la robustesse de nos résultats obtenus sur la dédifférenciation hépatocytaire des patients HA induite par YAP.

Les données obtenues par notre étude antérieure en 2015 viennent aussi reconforter nos résultats actuels. Effectivement, les marquages Ki67 réalisés à l'époque, et que nous avons refait sur un plus grand nombre d'échantillons, montrent clairement un déficit de prolifération hépatocytaire mais également cholangiocytaire. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'apparition de cette réaction ductulaire envahissant le parenchyme hépatique pourrait être la cause d'une transformation des hépatocytes préexistant en cholangiocytes.

La transfection d'hépatocytes primaires humains valide notre hypothèse sur la capacité de l'hépatocyte humain à se différencier en cellules HPC et biliaire. Nous avons montré qu'une activation constitutive d'un YAPS127A muté conduit au bout d'une semaine à une perte d'identité hépatocytaire, traduite par une diminution de l'expression des marqueurs hépatocytaires et une acquisition d'une identité biliaire. Cependant, ces hépatocytes conservaient l'expression des deux marqueurs, et la différenciation était plutôt observée à un stade d'hépatocytes intermédiaires. Notre étude a également montré la capacité de l'hépatocyte à se différencier dans un contexte alcoolique de modèle murin selon le régime Lieber DeCarli. Nous avons montré que l'activation hépatocytaire de YAP dans un contexte alcoolique conduit à une exacerbation du processus de différenciation. Dans un modèle de régénération murin aigu induit par le CCl<sub>4</sub>, nous avons mis en évidence que l'activation de YAP dans l'hépatocyte induit une diminution de la prolifération hépatocytaire, caractérisée par une diminution de l'incorporation du BrdU. L'aspect thérapeutique basé sur le traitement à la Dobutamine, un inhibiteur de l'activité de YAP, sur des hépatocytes intermédiaires (lignée HepaRG) révèle une efficacité à rediriger la différenciation de ces derniers vers un profil plus hépatocytaire. Nous avons également prouvé dans cette étude l'efficacité thérapeutique de la Dobutamine sur des hépatocytes primaires rares et précieux car provenant de l'explant d'un patient atteint d'HA. Le traitement Dobutamine avait pour conséquence de diminuer l'activité de YAP et de diminuer l'expression des marqueurs cholangiocytaires.

De nos jours, le lien entre le devenir des hépatocytes, des cellules cholangiocytaires et des HPCs présumés fait l'objet d'un grand débat (Greenbaum, 2011) (Michalopoulos, 2012). Alors que les données issues de traçage de lignage vient renforcer l'idée de cellules canalaire ressemblant à des progéniteurs et donnant naissance à des hépatocytes (Furuyama et al., 2011) (Huch et al., 2013), il est également prouvé que les hépatocytes pourraient donner naissance à des cellules de la lignée biliaires. Par exemple, les hépatocytes périportaux chez les patients atteints de troubles auto-immuns cholestatiques ou biliaires peuvent exprimer des marqueurs spécifiques aux voies biliaires (Gouw et al., 2011). De plus, la transplantation d'hépatocytes chez le rat démontre la possibilité d'une «Transdifférenciation» des hépatocytes en cellules canalaire (Michalopoulos et al., 2005). Cependant, Yimlamai et al ont permis de mettre en évidence ce pouvoir de l'hépatocyte à se dédifférencier en cellules HPCs et en cellules biliaires. Leurs études ont démontré que l'expression de YAP dans l'hépatocyte était la cause du processus de dédifférenciation hépatocytaire en HPC (Yimlamai et al., 2014a). Ces résultats viennent consolider nos résultats obtenus sur la dédifférenciation hépatocytaires des patients HA.

Nos résultats démontrent clairement une dérégulation de la voie Hippo dans les hépatocytes d'HA ; cependant nous, et d'autres équipes, n'avons pas pu mettre en évidence la cause de cette dérégulation. De nos jours, plusieurs acteurs ont été décrits pour influencer la régulation de la voie Hippo. La présence des acides biliaires est capable d'influencer l'activation de YAP par le biais de IQGAP1 en inhibant l'expression de l'E-cadhérine (Anakk et al., 2013). Ces acides biliaires pourraient être la cause de l'activation de YAP dans les hépatocytes d'HA due à la cholestase hépatique dans le foie de ces patients. De plus, nos résultats d'IHC (non publiés) démontrent clairement une perte de l'expression de l'E-cadhérine dans les hépatocytes des patients HA. Les analyses sur séquençage issue de la microdissection laser des hépatocytes démontrent une augmentation de l'expression

d'IQGAP1 dans l'HA et une diminution de l'expression des nuclear receptors Farnesoid X Receptor (FXR), et du Small Heterodimer Partner (SHP) responsable du métabolisme des acides biliaires. Au laboratoire, nous avons déjà commencé à récolter les contenues des vésicules biliaires des patients pour de futures analyses sur ce sujet.

Le réarrangement du cytosquelette au niveau de la cellule lors de l'exposition à différents stimuli mécaniques, tels que la rigidité de la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que les tensions physiques induites par la confluence cellulaire, est capable de modifier la localisation de YAP et de TAZ (Mammoto and Ingber, 2009) (Goldmann, 2014) (Jaalouk and Lammerding, 2009). Dans l'HA, nous observons un remodelage au niveau de la composition de la matrice extracellulaire représenté par une perte d'expression de la fibronectine en faveur d'un enrichissement en laminine (Dubuquoy et al., 2015a). De plus, au vu de la fibrose sous-jacente, nos résultats de microarray sur hépatocytes micro-disséqués démontrent que l'hépatocyte participe également au remodelage de la MEC avec une augmentation de l'expression de nombreux types de collagènes différents (COL1A1, COL11A1, COL9A2, COL6A2...). De manière très intéressante, des données récentes de la littérature confirment que l'activation de YAP dans l'hépatocyte participe à la fibrose hépatique en induisant l'expression de gènes fibrosant comme le COL1A1 (Mooring et al., 2019). Sur le plan fibroblastique, l'activation de YAP et son effet sur la transition et l'activation des cellules étoilées (HSC) en cellules myofibroblastiques est très bien documenté. L'inhibition YAP par des siRNA spécifiques ou par un traitement à la vertéporfine (VP), qui perturbe l'interaction YAP / TAZ-TEAD, réduit l'expression du gène cible et empêche la transdifférenciation des HSC inactives en myofibroblastes. Des études in-vivo et in-vitro ont montrées que l'activation de YAP médiée par la signalisation de Hedgehog s'est avérée nécessaire pour la transdifférenciation et la prolifération des HSC par un processus glutaminolytique (Du et al., 2018). Dans l'HA, nos résultats d'IHC semblent montrer une localisation nucléaire de YAP

dans les myofibroblastes infiltrant le parenchyme ; cependant plus d'études sont nécessaires pour confirmer cette observation.

De nos jours, de plus en plus d'études récentes pointent le rôle inflammatoire que pourrait exercer YAP et TAZ dans les pathologies hépatiques. Une étude récente a montré que l'inhibition de TAZ au niveau hépatocytaire, dans un modèle hépatique de NASH, a pour conséquence une diminution de l'inflammation et de l'infiltrat inflammatoire (Wang et al., 2016b). Cette étude a montré que l'activation de TAZ au niveau hépatocytaire avait également pour conséquence une augmentation de l'expression des ligands de la voie Hedgehog qui influence la transdifférenciation des HSC en myofibroblastes et la survenue de la fibrose. Finalement, une étude récente publiée par l'équipe de Yimlamai a mis en évidence une implication de YAP dans l'aggravation de l'inflammation hépatique. Cette étude a montré que l'activation de YAP au niveau hépatocytaire dans un modèle murin avait pour conséquence une augmentation des marqueurs inflammatoires IL1 $\beta$  et TNF $\alpha$  (Mooring et al., 2019). Étonnamment, nos résultats obtenus avec le modèle d'alcoolisation de Lieber-De-Carli et un YAPS127A transduit dans les hépatocytes à l'aide d'un adénovirus spécifique, a montré pour la première fois une infiltration de cellules inflammatoires dans le parenchyme, ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'IL1 $\beta$  et de TNF $\alpha$ .

L'analyse microarray de la microdissection laser des hépatocytes HA révèlent un profil particulier dans l'exacerbation de l'expression de plusieurs chimiokines attractantes du PNN. L'expression de nombreuses chimiokines, notamment CXCL5, CXCL1 et CXCL8 étaient surexprimées dans les hépatocytes HA, et se retrouvaient dans le top 10 des gènes surexprimés dans notre listing. De nos jours, peu d'études ont mis en évidence le lien entre l'expression de ces chimioattractants du PNN et l'activation de YAP dans l'hépatocytes. Cependant, des études ont montré que l'expression de CXCL5 dans d'autres types cellulaires était régulée par le gène YAP, faisant de lui un de ces gènes cibles (Hao et al., 2017) (Wang et

al., 2016a) (Zanconato et al., 2015) et que son expression était associée à un mauvais pronostic dans l'HA (Dominguez et al., 2009). Des données de la littérature viennent renforcer le rôle que pourrait avoir la dédifférenciation hépatocytaire en cellules biliaires dans la participation au processus inflammatoire. L'analyse transcriptomique des cellules Krt7+ isolées par microdissection laser sur explant d'HA inclut en paraffine, réalisé par l'équipe de PAU SANCHO-BRU, a récemment mis en évidence la contribution des cellules biliaires dans la survenue du profil inflammatoire (Aguilar- Bravo et al., 2019). Leurs résultats montraient une nette induction de l'expression de nombreuses chimiokines attractantes du PNN, comprenant CCL28, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6 et CXCL8 au niveau de ces cellules par rapport aux cellules Krt7- . Ces résultats sont en concordance avec nos résultats obtenus sur la microdissection laser des hépatocytes YAP+, sur tissu congelé, au regard de l'expression de la Krt7 par une majorité des hépatocytes d'HA en dédifférenciation. La microdissection laser réalisée par l'équipe de PAU SANCHO-BRU n'exclurait pas la présence de cellules hépatocytaires bien avancées dans le processus de dédifférenciation. Ces résultats regroupés montrent clairement que l'activation de YAP au niveau hépatocytaire des patients HA pourrait être un facteur clé dans l'exacerbation du profil inflammatoire et particulièrement au niveau de l'infiltration des PNN.

# **Conclusion générale et perspectives des travaux**



Nos travaux ont permis de mettre en évidence une profonde altération des mécanismes impliqués dans les processus inflammatoires et de régénération hépatique chez l'HA.

Au niveau du processus inflammatoire, nous avons pu montrer la voie NOD1 comme étant un acteur majeur dans les interactions du PNN avec l'hépatocyte, et que la modulation de cette voie été capable de limiter les lésions hépatiques induites par les PNN dans un modèle d'ischémie-reperfusion murin. Ces résultats suggèrent que NOD1 pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour prévenir les lésions induites par les PNN.

D'autre part, nous avons pu mettre en évidence une importante dérégulation de la voie IL33/sST2 impliquée dans la régulation de la capacité migratoire du PNN vers les sites infectieux au cours de l'HA. Les taux de sST2 bas étaient associés à la survie des patients et à une faible probabilité d'infection. Nos résultats suggèrent que l'IL-33 est une piste intéressante pour réduire le risque infectieux au cours de l'HA sévère.

Au niveau du défaut de régénération, nous avons pu identifier la voie Hippo/YAP comme étant profondément dérégulé. Nous avons pu mettre en évidence une activation anormale de YAP au niveau hépatocytaire des patients HA conduisant à leur dédifférenciation et à la perte de leurs fonctions. Nos résultats suggèrent que la voie Hippo/YAP est une cible thérapeutique intéressante pour améliorer la régénération hépatique dans l'HA.

Les perspectives de nos études sont nombreuses. Parmi ces perspectives, nous allons étudier l'implication de YAP dans la survenue du processus inflammatoire et fibrotique dans l'HA. Nous essayerons de mettre en évidence le signal impliqué dans l'activation de YAP dans l'hépatocyte, avec comme hypothèse l'implication des acides biliaires dans l'activation de YAP par le biais de IQGAP1. Nous allons mettre en place des études pour identifier des gènes cibles inconnus de YAP pouvant être impliqués dans les processus de dédifférenciation hépatocytaire.

# Bibliographie

- Abram, C.L., and Lowell, C.A. (2009). The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 339–362.
- Aguilar-Bravo, B., Rodrigo-Torres, D., Ariño, S., Coll, M., Pose, E., Blaya, D., Graupera, I., Perea, L., Vallverdú, J., Rubio-Tomás, T., et al. (2019). Ductular Reaction Cells Display an Inflammatory Profile and Recruit Neutrophils in Alcoholic Hepatitis. *Hepatology* *69*, 2180–2195.
- Albrecht, J.H., Hoffman, J.S., Kren, B.T., and Steer, C.J. (1993). Cyclin and cyclin-dependent kinase 1 mRNA expression in models of regenerating liver and human liver diseases. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *265*, G857–G864.
- Altamirano, J., Miquel, R., Katoonizadeh, A., Abraldes, J.G., Duarte-Rojo, A., Louvet, A., Augustin, S., Mookerjee, R.P., Michelena, J., Smyrk, T.C., et al. (2014). A Histologic Scoring System for Prognosis of Patients With Alcoholic Hepatitis. *Gastroenterology* *146*, 1231-1239.e6.
- Alves, P.S., Camilo, E.A., and Correia, J.P. THE SGOT/SGPT RATIO IN ALCOHOLIC LIVER DISEASE. *6*.
- Alves-Filho, J.C., Sônego, F., Souto, F.O., Freitas, A., Verri, W.A., Auxiliadora-Martins, M., Basile-Filho, A., McKenzie, A.N., Xu, D., Cunha, F.Q., et al. (2010). Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat. Med.* *16*, 708–712.
- Amini, M. (2010). Alcoholic hepatitis 2010: A clinician’s guide to diagnosis and therapy. *World J. Gastroenterol.* *16*, 4905.
- Anakk, S., Bhosale, M., Schmidt, V.A., Johnson, R.L., Finegold, M.J., and Moore, D.D. (2013). Bile acids activate YAP to promote liver carcinogenesis. *Cell Rep.* *5*, 1060–1069.
- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* *11*, R106.
- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *31*, 166–169.
- Apte, U., Gkretsi, V., Bowen, W.C., Mars, W.M., Luo, J.-H., Donthamsetty, S., Orr, A., Monga, S.P.S., Wu, C., and Michalopoulos, G.K. (2009). Enhanced liver regeneration following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase. *Hepatology* *50*, 844–851.
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giullitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., and Piccolo, S. (2013). A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* *154*, 1047–1059.
- Argemi, J., Latasa, M.U., Atkinson, S.R., Blokhin, I.O., Massey, V., Gue, J.P., Cabezas, J., Lozano, J.J., Van Booven, D., Bell, A., et al. (2019). Defective HNF4alpha-dependent gene expression as a driver of hepatocellular failure in alcoholic hepatitis. *Nat. Commun.* *10*.
- Aziz, A., Sebastian, S., and Dilworth, F.J. (2012). The Origin and Fate of Muscle Satellite Cells. *Stem Cell Rev. Rep.* *8*, 609–622.
- Bae, J.S., Kim, S.M., and Lee, H. (2017). The Hippo signaling pathway provides novel anti-cancer drug targets. *Oncotarget* *8*.

- Baekkevold, E.S., Roussigné, M., Yamanaka, T., Johansen, F.-E., Jahnsen, F.L., Amalric, F., Brandtzaeg, P., Erard, M., Haraldsen, G., and Girard, J.-P. (2003). Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am. J. Pathol.* *163*, 69–79.
- Bai, H., Gayyed, M.F., Lam-Himlin, D.M., Klein, A.P., Nayar, S.K., Xu, Y., Khan, M., Argani, P., Pan, D., and Anders, R.A. (2012a). Expression of Yes-associated protein modulates Survivin expression in primary liver malignancies. *Hum. Pathol.* *43*, 1376–1385.
- Bai, H., Zhang, N., Xu, Y., Chen, Q., Khan, M., Potter, J.J., Nayar, S.K., Cornish, T., Alpini, G., Bronk, S., et al. (2012b). Yes-Associated Protein Regulates the Hepatic Response After Bile Duct Ligation. *Hepatol. Baltim. Md* *56*, 1097–1107.
- Bai, H., Zhu, Q., Surcel, A., Luo, T., Ren, Y., Guan, B., Liu, Y., Wu, N., Joseph, N.E., Wang, T.-L., et al. (2016). Yes-associated protein impacts adherens junction assembly through regulating actin cytoskeleton organization. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *311*, G396-411.
- Bamboato, Z.M., Balachandran, V.P., Ocuin, L.M., Obaid, H., Plitas, G., and DeMatteo, R.P. (2010). Toll-like receptor 9 inhibition confers protection from liver ischemia-reperfusion injury. *Hepatol. Baltim. Md* *51*, 621–632.
- Bao, Y., Nakagawa, K., Yang, Z., Ikeda, M., Withanage, K., Ishigami-Yuasa, M., Okuno, Y., Hata, S., Nishina, H., and Hata, Y. (2011). A cell-based assay to screen stimulators of the Hippo pathway reveals the inhibitory effect of dobutamine on the YAP-dependent gene transcription. *J. Biochem. (Tokyo)* *150*, 199–208.
- Barreiro, O., Yáñez-Mó, M., Serrador, J.M., Montoya, M.C., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Furthmayr, H., and Sánchez-Madrid, F. (2002). Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J. Cell Biol.* *157*, 1233.
- Basu, S., Totty, N.F., Irwin, M.S., Sudol, M., and Downward, J. (2003). Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol. Cell* *11*, 11–23.
- Becker, U., Deis, A., Sorensen, T.I., Gronbaek, M., Borch-Johnsen, K., Muller, C.F., Schnohr, P., and Jensen, G. (1996). Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex, and age: A prospective population study. *Hepatology* *23*, 1025–1029.
- Bellentani, S., and Tiribelli, C. (2001). The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. *J. Hepatol.* *35*, 531–537.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* *57*, 289–300.
- Bertola, A., Park, O., and Gao, B. (2013). Chronic plus Binge Ethanol Feeding Synergistically Induces Neutrophil Infiltration and Liver Injury: a Critical Role for E-selectin. *Hepatol. Baltim. Md* *58*, 1814–1823.
- Blindenbacher, A., Wang, X., Langer, I., Savino, R., Terracciano, L., and Heim, M.H. (2003). Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatol. Baltim. Md* *38*, 674–682.
- Borowiak, M., Garratt, A.N., Wüstefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C., and Birchmeier, C. (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 10608–10613.

Boulter, L., Govaere, O., Bird, T.G., Radulescu, S., Ramachandran, P., Pellicoro, A., Ridgway, R.A., Seo, S.S., Spee, B., Van Rooijen, N., et al. (2012). Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat. Med.* *18*, 572–579.

Boussif, A., Rolas, L., Weiss, E., Bouriche, H., Moreau, R., and Périainin, A. (2016). Impaired intracellular signaling, myeloperoxidase release and bactericidal activity of neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis. *J. Hepatol.* *64*, 1041–1048.

Boyer, J.L. (2013). Bile Formation and Secretion. In *Comprehensive Physiology*, R. Terjung, ed. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), p.

Breitkopf-Heinlein, K., Meyer, C., König, C., Gaitantzi, H., Addante, A., Thomas, M., Wiercinska, E., Cai, C., Li, Q., Wan, F., et al. (2017). BMP-9 interferes with liver regeneration and promotes liver fibrosis. *Gut* *66*, 939–954.

Brennecke, P., Anders, S., Kim, J.K., Kołodziejczyk, A.A., Zhang, X., Proserpio, V., Baying, B., Benes, V., Teichmann, S.A., Marioni, J.C., et al. (2013). Accounting for technical noise in single-cell RNA-seq experiments. *Nat. Methods* *10*, 1093–1095.

Brunner, M., Krenn, C., Roth, G., Moser, B., Dworschak, M., Jensen-Jarolim, E., Spittler, A., Sautner, T., Bonaros, N., Wolner, E., et al. (2004). Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma. *Intensive Care Med.* *30*, 1468–1473.

Cabré, E., Rodríguez-Iglesias, P., Caballería, J., Quer, J.C., Sánchez-Lombraña, J.L., Parés, A., Papo, M., Planas, R., Gassull, M.A., and Spanish Group for the Study of Alcoholic Hepatitis (2000). Short- and long-term outcome of severe alcohol-induced hepatitis treated with steroids or enteral nutrition: A multicenter randomized trial. *Hepatology* *32*, 36–42.

Cai, J., Zhang, N., Zheng, Y., de Wilde, R.F., Maitra, A., and Pan, D. (2010). The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes Dev.* *24*, 2383–2388.

Campbell, J.S., Prichard, L., Schaper, F., Schmitz, J., Stephenson-Famy, A., Rosenfeld, M.E., Argast, G.M., Heinrich, P.C., and Fausto, N. (2001). Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *J. Clin. Invest.* *107*, 1285–1292.

Canbay, A., Feldstein, A.E., Higuchi, H., Werneburg, N., Grambihler, A., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2003). Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatol. Baltim. Md* *38*, 1188–1198.

Carpentier, R., Suñer, R.E., van Hul, N., Kopp, J.L., Beaudry, J., Cordi, S., Antoniou, A., Raynaud, P., Lepreux, S., Jacquemin, P., et al. (2011). Embryonic Ductal Plate Cells Give Rise to Cholangiocytes, Periportal Hepatocytes, and Adult Liver Progenitor Cells. *Gastroenterology* *141*, 1432-1438.e4.

Cederbaum, A.I. (2012). Alcohol metabolism. *Clin. Liver Dis.* *16*, 667–685.

Çekmez, F., Fidanci, M.K., Ayar, G., Saldır, M., Karaoglu, A., Gündüz, R.C., Tunc, T., and Kalkan, G. (2016). Diagnostic Value of Upar, IL-33, and ST2 Levels in Childhood Sepsis. *Clin. Lab.* *62*, 751–755.

Chart, R.S., Price, D.T., Sue, S.R., Meyers, W.C., and Jirtle, R.L. (1995). Down-regulation of transforming growth factor beta receptor type I, II, and III during liver regeneration. *Am. J. Surg.* *169*, 126–132.

- Chen, C.-J., Liang, K.-Y., Chang, A.-S., Chang, Y.-C., Lu, S.-N., Liaw, Y.-F., Chang, W.-Y., Sheen, M.-C., and Lin, T.-M. (1991). Effects of hepatitis B virus, alcohol drinking, cigarette smoking and familial tendency on hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *13*, 398–406.
- Chen, L., Zhang, W., Liang, H., Zhou, Q., Ding, Z., Yang, H., Liu, W., Wu, Y., Man, Q., Zhang, B., et al. (2014). Activin A induces growth arrest through a SMAD- dependent pathway in hepatic progenitor cells. *Cell Commun. Signal.* *12*, 18.
- Chiaromonte, M.G., Donaldson, D.D., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (1999). An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J. Clin. Invest.* *104*, 777–785.
- Choi, T.-Y., Ninov, N., Stainier, D.Y.R., and Shin, D. (2014). Extensive conversion of hepatic biliary epithelial cells to hepatocytes after near total loss of hepatocytes in zebrafish. *Gastroenterology* *146*, 776–788.
- Cordero-Espinoza, L., and Huch, M. (2018). The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. *J. Clin. Invest.* *128*, 85–96.
- Cotsarelis, G., Sun, T.-T., and Lavker, R.M. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* *61*, 1329–1337.
- Crabb, D.W., Bataller, R., Chalasani, N.P., Kamath, P.S., Lucey, M., Mathurin, P., McClain, C., McCullough, A., Mitchell, M.C., Morgan, T.R., et al. (2016). Standard Definitions and Common Data Elements for Clinical Trials in Patients With Alcoholic Hepatitis: Recommendation From the NIAAA Alcoholic Hepatitis Consortia. *Gastroenterology* *150*, 785–790.
- Cressman, D.E., Greenbaum, L.E., DeAngelis, R.A., Ciliberto, G., Furth, E.E., Poli, V., and Taub, R. (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* *274*, 1379–1383.
- Dambach, D.M., Watson, L.M., Gray, K.R., Durham, S.K., and Laskin, D.L. (2002). Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Hepatology* *35*, 1093–1103.
- Date, M., Matsuzaki, K., Matsushita, M., Tahashi, Y., Sakitani, K., and Inoue, K. (2000). Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury. *J. Hepatol.* *32*, 251–260.
- de La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C.A., Buendia, M.A., Soubrane, O., Fabre, M., Chelly, J., Beldjord, C., Kahn, A., et al. (1998). Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 8847–8851.
- DeRan, M., Yang, J., Shen, C.-H., Peters, E.C., Fitamant, J., Chan, P., Hsieh, M., Zhu, S., Asara, J.M., Zheng, B., et al. (2014). Energy stress regulates hippo-YAP signaling involving AMPK-mediated regulation of angiotensin-like 1 protein. *Cell Rep.* *9*, 495–503.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature* *425*, 8.

- Dharancy, S., Body-Malapel, M., Louvet, A., Berrebi, D., Gantier, E., Gosset, P., Viala, J., Hollebecque, A., Moreno, C., Philpott, D.J., et al. (2010). Neutrophil migration during liver injury is under nucleotide-binding oligomerization domain 1 control. *Gastroenterology* *138*, 1546–1556, 1556.e1-5.
- Ding, B.-S., Nolan, D.J., Butler, J.M., James, D., Babazadeh, A.O., Rosenwaks, Z., Mittal, V., Kobayashi, H., Shido, K., Lyden, D., et al. (2010). Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* *468*, 310–315.
- Ding, B.-S., Cao, Z., Lis, R., Nolan, D.J., Guo, P., Simons, M., Penfold, M.E., Shido, K., Rabbany, S.Y., and Rafii, S. (2014). Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis. *Nature* *505*, 97–102.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *29*, 15–21.
- Doering, D.C., Borowicz, J.L., and Crockett, E.T. (2003). Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin. Pathol.* *3*, 3.
- Dominguez, M., Miquel, R., Colmenero, J., Moreno, M., García–Pagán, J., Bosch, J., Arroyo, V., Ginès, P., Caballería, J., and Bataller, R. (2009). Hepatic Expression of CXC Chemokines Predicts Portal Hypertension and Survival in Patients With Alcoholic Hepatitis. *Gastroenterology* *136*, 1639–1650.
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M.F., Anders, R.A., Maitra, A., and Pan, D. (2007a). Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* *130*, 1120–1133.
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M.F., Anders, R.A., Maitra, A., and Pan, D. (2007b). Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* *130*, 1120–1133.
- Dorrell, C., Erker, L., Schug, J., Kopp, J.L., Canaday, P.S., Fox, A.J., Smirnova, O., Duncan, A.W., Finegold, M.J., Sander, M., et al. (2011). Prospective isolation of a bipotential clonogenic liver progenitor cell in adult mice. *Genes Dev.* *25*, 1193–1203.
- Doucet, C., Brouty-Boyé, D., Pottin-Clémenceau, C., Canonica, G.W., Jasmin, C., and Azzarone, B. (1998). Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. *J. Clin. Invest.* *101*, 2129–2139.
- Du, K., Hyun, J., Premont, R.T., Choi, S.S., Michelotti, G.A., Swiderska-Syn, M., Dalton, G.D., Thelen, E., Rizi, B.S., Jung, Y., et al. (2018). Hedgehog-YAP Signaling Pathway Regulates Glutaminolysis to Control Activation of Hepatic Stellate Cells. *Gastroenterology* *154*, 1465-1479.e13.
- Dubuquoy, L., Louvet, A., Lassailly, G., Truant, S., Boleslawski, E., Artru, F., Maggioro, F., Gantier, E., Buob, D., Leteurtre, E., et al. (2015a). Progenitor cell expansion and impaired hepatocyte regeneration in explanted livers from alcoholic hepatitis. *Gut* *64*, 1949–1960.
- Dubuquoy, L., Louvet, A., Lassailly, G., Truant, S., Boleslawski, E., Artru, F., Maggioro, F., Gantier, E., Buob, D., Leteurtre, E., et al. (2015b). Progenitor cell expansion and impaired hepatocyte regeneration in explanted livers from alcoholic hepatitis. *Gut* *64*, 1949–1960.

- Duffield, J.S., Forbes, S.J., Constandinou, C.M., Clay, S., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Lang, R., and Iredale, J.P. (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. Invest.* *115*, 56–65.
- Dunn, W., Jamil, L.H., Brown, L.S., Wiesner, R.H., Kim, W.R., Menon, K.V.N., Malinchoc, M., Kamath, P.S., and Shah, V. (2005). MELD accurately predicts mortality in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology* *41*, 353–358.
- Dupont, S. (2016). Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signalling and mechanotransduction. *Exp. Cell Res.* *343*, 42–53.
- Edenberg, H.J. (2007). The Genetics of Alcohol Metabolism. *30*, 9.
- Ehling, J., Bartneck, M., Wei, X., Gremse, F., Fech, V., Möckel, D., Baeck, C., Hittatiya, K., Eulberg, D., Luedde, T., et al. (2014). CCL2-dependent infiltrating macrophages promote angiogenesis in progressive liver fibrosis. *Gut* *63*, 1960–1971.
- El-Assal, O., Hong, F., Kim, W.-H., Radaeva, S., and Gao, B. (2004). IL-6-deficient mice are susceptible to ethanol-induced hepatic steatosis: IL-6 protects against ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial permeability transition in the liver. *Cell. Mol. Immunol.* *1*, 205–211.
- Enzo, E., Santinon, G., Pocaterra, A., Aragona, M., Bresolin, S., Forcato, M., Grifoni, D., Pession, A., Zanconato, F., Guzzo, G., et al. (2015). Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity. *EMBO J.* *34*, 1349–1370.
- Español-Suñer, R., Carpentier, R., Van Hul, N., Legry, V., Achouri, Y., Cordi, S., Jacquemin, P., Lemaigre, F., and Leclercq, I.A. (2012). Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice. *Gastroenterology* *143*, 1564-1575.e7.
- Fallowfield, J.A., Mizuno, M., Kendall, T.J., Constandinou, C.M., Benyon, R.C., Duffield, J.S., and Iredale, J.P. (2007). Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 5288–5295.
- Fan, F., He, Z., Kong, L.-L., Chen, Q., Yuan, Q., Zhang, S., Ye, J., Liu, H., Sun, X., Geng, J., et al. (2016). Pharmacological targeting of kinases MST1 and MST2 augments tissue repair and regeneration. *Sci. Transl. Med.* *8*, 352ra108-352ra108.
- Fitamant, J., Kottakis, F., Benhamouche, S., Tian, H.S., Chuvin, N., Parachoniak, C.A., Nagle, J.M., Perera, R.M., Lapouge, M., Deshpande, V., et al. (2015). YAP Inhibition Restores Hepatocyte Differentiation in Advanced HCC, Leading to Tumor Regression. *Cell Rep.* *10*, 1692–1707.
- Font-Burgada, J., Shalpour, S., Ramaswamy, S., Hsueh, B., Rossell, D., Umemura, A., Taniguchi, K., Nakagawa, H., Valasek, M.A., Ye, L., et al. (2015). Hybrid Periportal Hepatocytes Regenerate the Injured Liver without Giving Rise to Cancer. *Cell* *162*, 766–779.
- Fortner, J.G., and Blumgart, L.H. (2001). A historic perspective of liver surgery for tumors at the end of the millennium. *J. Am. Coll. Surg.* *193*, 210–222.
- Friedman, S.L., and Arthur, M.J. (1989). Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J. Clin. Invest.* *84*, 1780–1785.



- Fukumura, A., Tsutsumi, M., Tsuchishima, M., Hayashi, N., Fukura, M., Yano, H., Ozaki, K., and Takase, S. (2007). Effect of the inducer of interleukin-6 (ME3738) on rat liver treated with ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *31*, S49-53.
- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., et al. (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat. Genet.* *43*, 34–41.
- Gao, B. (2005). Cytokines, STATs and liver disease. *Cell. Mol. Immunol.* *2*, 92–100.
- Gao, B., and Bataller, R. (2011a). Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutic Targets. *Gastroenterology* *141*, 1572–1585.
- Gao, B., and Bataller, R. (2011b). Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutic Targets. *Gastroenterology* *141*, 1572–1585.
- Gao, B., Ahmad, M.F., Nagy, L.E., and Tsukamoto, H. (2019). Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* *70*, 249–259.
- Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J.C. (2006). Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *21 Suppl 3*, S3-6.
- Gentleman, R., Carey, V., Huber, W., and Hahne, F. (2019). genefilter: genefilter: methods for filtering genes from high-throughput experiments (R package version 1.66.0).
- Gilgenkrantz, H., and Collin de l'Hortet, A. (2011). New insights into liver regeneration. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* *35*, 623–629.
- Golding, M., Sarraf, C.E., Lalani, E.N., Anilkumar, T.V., Edwards, R.J., Nagy, P., Thorgeirsson, S.S., and Alison, M.R. (1995). Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. *Hepatol. Baltim. Md* *22*, 1243–1253.
- Goldmann, W.H. (2014). Mechanosensation: a basic cellular process. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *126*, 75–102.
- Goulev, Y., Fauny, J.D., Gonzalez-Marti, B., Flagiello, D., Silber, J., and Zider, A. (2008). SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Curr. Biol. CB* *18*, 435–441.
- Gouw, A.S.H., Clouston, A.D., and Theise, N.D. (2011). Ductular reactions in human liver: Diversity at the interface. *Hepatology* *54*, 1853–1863.
- Grappone, C., Pinzani, M., Parola, M., Pellegrini, G., Caligiuri, A., DeFranco, R., Marra, F., Herbst, H., Alpini, G., and Milani, S. (1999). Expression of platelet-derived growth factor in newly formed cholangiocytes during experimental biliary fibrosis in rats. *J. Hepatol.* *31*, 100–109.
- Greenbaum, L.E. (2011). The Ductal Plate: A Source of Progenitors and Hepatocytes in the Adult Liver. *Gastroenterology* *141*, 1152–1155.
- Grijalva, J.L., Huizenga, M., Mueller, K., Rodriguez, S., Brazzo, J., Camargo, F., Sadri-Vakili, G., and Vakili, K. (2014). Dynamic alterations in Hippo signaling pathway and YAP activation during liver regeneration. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *307*, G196–G204.

- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* *453*, 314–321.
- Halder, G., and Johnson, R.L. (2011). Hippo signaling: growth control and beyond. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 9–22.
- Han, D., Byun, S.-H., Park, S., Kim, J., Kim, I., Ha, S., Kwon, M., and Yoon, K. (2015). YAP/TAZ enhance mammalian embryonic neural stem cell characteristics in a Tead-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *458*, 110–116.
- Hao, F., Xu, Q., Zhao, Y., Stevens, J.V., Young, S.H., Sinnott-Smith, J., and Rozengurt, E. (2017). Insulin Receptor and GPCR Crosstalk Stimulates YAP via PI3K and PKD in Pancreatic Cancer Cells. *Mol. Cancer Res. MCR* *15*, 929–941.
- Harvey, K.F., Pflieger, C.M., and Hariharan, I.K. (2003). The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* *114*, 457–467.
- Harvey, K.F., Zhang, X., and Thomas, D.M. (2013). The Hippo pathway and human cancer. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 246–257.
- Hatton, J., Burton, A., Nash, H., Munn, E., Burgoyne, L., and Sheron, N. (2009). Drinking patterns, dependency and life-time drinking history in alcohol-related liver disease. *Addict. Abingdon Engl.* *104*, 587–592.
- Hellebrekers, P., Vrisekoop, N., and Koenderman, L. (2018). Neutrophil phenotypes in health and disease. *Eur. J. Clin. Invest.* *48 Suppl 2*, e12943.
- Higgins, G.A., Anderson, R.E., Higgins, G.M., and Anderson, R.M. (1931). Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.
- Hill, D.B., Marsano, L., Cohen, D., Allen, J., Shedlofsky, S., and McClain, C.J. (1992). Increased plasma interleukin-6 concentrations in alcoholic hepatitis. *J. Lab. Clin. Med.* *119*, 547–552.
- Hines, I.N., and Wheeler, M.D. (2004). Recent advances in alcoholic liver disease III. Role of the innate immune response in alcoholic hepatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *287*, G310-314.
- Hirano, T., Kaplowitz, N., Tsukamoto, H., Kamimura, S., and Fernandez-Checa, J.C. (1992). Hepatic mitochondrial glutathione depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. *Hepatology. Baltim. Md* *16*, 1423–1427.
- Holt, A.P., Haughton, E.L., Lalor, P.F., Filer, A., Buckley, C.D., and Adams, D.H. (2009). Liver myofibroblasts regulate infiltration and positioning of lymphocytes in human liver. *Gastroenterology* *136*, 705–714.
- Hong, C.-W. (2017). Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune Netw.* *17*, 298–306.
- Hong, A.W., Meng, Z., and Guan, K.-L. (2016). The Hippo pathway in intestinal regeneration and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *13*, 324–337.
- Hong, F., Kim, W.-H., Tian, Z., Jaruga, B., Ishac, E., Shen, X., and Gao, B. (2002). Elevated interleukin-6 during ethanol consumption acts as a potential endogenous protective cytokine against ethanol-

induced apoptosis in the liver: involvement of induction of Bcl-2 and Bcl-x(L) proteins. *Oncogene* 21, 32–43.

Hong, F., Radaeva, S., Pan, H., Tian, Z., Veech, R., and Gao, B. (2004). Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver disease. *Hepatology* 40, 933–941.

Hoogerwerf, J.J., Tanck, M.W.T., van Zoelen, M.A.D., Wittebole, X., Laterre, P.-F., and van der Poll, T. (2010). Soluble ST2 plasma concentrations predict mortality in severe sepsis. *Intensive Care Med.* 36, 630–637.

Horiguchi, N., Lafdil, F., Miller, A.M., Park, O., Wang, H., Rajesh, M., Mukhopadhyay, P., Fu, X.Y., Pacher, P., and Gao, B. (2010). Dissociation between liver inflammation and hepatocellular damage induced by carbon tetrachloride in myeloid cell-specific signal transducer and activator of transcription 3 gene knockout mice. *Hepatology* 51, 1724–1734.

Hossain, Z., Ali, S.M., Ko, H.L., Xu, J., Ng, C.P., Guo, K., Qi, Z., Ponniah, S., Hong, W., and Hunziker, W. (2007). Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of *Wwtr1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1631–1636.

Hu, J., Srivastava, K., Wieland, M., Runge, A., Mogler, C., Besemfelder, E., Terhardt, D., Vogel, M.J., Cao, L., Korn, C., et al. (2014). Endothelial cell-derived angiopoietin-2 controls liver regeneration as a spatiotemporal rheostat. *Science* 343, 416–419.

Huang, G., and Brigstock, D.R. (2012). Regulation of hepatic stellate cells by connective tissue growth factor. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 17, 2495–2507.

Huang, H., Tohme, S., Al-Khafaji, A.B., Tai, S., Loughran, P., Chen, L., Wang, S., Kim, J., Billiar, T., Wang, Y., et al. (2015). Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. *Hepatology* 62, 600–614.

Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., and Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122, 421–434.

Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., van Es, J.H., van de Wetering, M., Li, V.S.W., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., Haft, A., et al. (2013). In vitro expansion of single *Lgr5*<sup>+</sup> liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494, 247–250.

Huh, C.-G., Factor, V.M., Sánchez, A., Uchida, K., Conner, E.A., and Thorgeirsson, S.S. (2004). Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4477–4482.

Hur, M., Kim, H., Kim, H.J., Yang, H.S., Magrini, L., Marino, R., Cardelli, P., Di Somma, S., and GREAT Network (2015). Soluble ST2 has a prognostic role in patients with suspected sepsis. *Ann. Lab. Med.* 35, 570–577.

Hyun, J., Oh, S.-H., Premont, R.T., Guy, C.D., Berg, C.L., and Diehl, A.M. (2019). Dysregulated activation of fetal liver programme in acute liver failure. *Gut* 68, 1076–1087.

Ide, M., Kuwamura, M., Kotani, T., Sawamoto, O., and Yamate, J. (2005). Effects of gadolinium chloride (GdCl<sub>3</sub>) on the appearance of macrophage populations and fibrogenesis in thioacetamide-induced rat hepatic lesions. *J. Comp. Pathol.* 133, 92–102.

- Jaalouk, D.E., and Lammerding, J. (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 63–73.
- Jaeschke, H., Farhood, A., Bautista, A.P., Spolarics, Z., and Spitzer, J.J. (1993a). Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am. J. Physiol.* *264*, G801–809.
- Jaeschke, H., Farhood, A., Bautista, A.P., Spolarics, Z., Spitzer, J.J., and Smith, C.W. (1993b). Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* *17*, 915–923.
- Ji, C., Chan, C., and Kaplowitz, N. (2006). Predominant role of sterol response element binding proteins (SREBP) lipogenic pathways in hepatic steatosis in the murine intragastric ethanol feeding model. *J. Hepatol.* *45*, 717–724.
- Justice, R.W., Zilian, O., Woods, D.F., Noll, M., and Bryant, P.J. (1995). The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev.* *9*, 534–546.
- Kakkar, R., and Lee, R.T. (2008). The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat. Rev. Drug Discov.* *7*, 827–840.
- Kamimura, S., and Tsukamoto, H. (1995). Cytokine gene expression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology* *22*, 1304–1309.
- Kamiya, A., Kakinuma, S., Yamazaki, Y., and Nakauchi, H. (2009). Enrichment and Clonal Culture of Progenitor Cells During Mouse Postnatal Liver Development in Mice. *Gastroenterology* *137*, 1114–1126.e14.
- Karlmark, K.R., Weiskirchen, R., Zimmermann, H.W., Gassler, N., Ginhoux, F., Weber, C., Merad, M., Luedde, T., Trautwein, C., and Tacke, F. (2009). Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* *50*, 261–274.
- Katoonizadeh, A., Nevens, F., Verslype, C., Pirenne, J., and Roskams, T. (2006). Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* *26*, 1225–1233.
- Keshavarzian, A., Farhadi, A., Forsyth, C.B., Rangan, J., Jakate, S., Shaikh, M., Banan, A., and Fields, J.Z. (2009). Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J. Hepatol.* *50*, 538–547.
- Kim, W., Khan, S.K., Gvozdenovic-Jeremic, J., Kim, Y., Dahlman, J., Kim, H., Park, O., Ishitani, T., Jho, E.-H., Gao, B., et al. (2017). Hippo signaling interactions with Wnt/ $\beta$ -catenin and Notch signaling repress liver tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* *127*, 137–152.
- Knittel, T., Dinter, C., Kobold, D., Neubauer, K., Mehde, M., Eichhorst, S., and Ramadori, G. (1999). Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair. *Am. J. Pathol.* *154*, 153–167.
- Kodaka, M., and Hata, Y. (2015). The mammalian Hippo pathway: regulation and function of YAP1 and TAZ. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *72*, 285–306.

- Konstantinou, E.K., Notomi, S., Kosmidou, C., Brodowska, K., Al-Moujahed, A., Nicolaou, F., Tsoka, P., Gragoudas, E., Miller, J.W., Young, L.H., et al. (2017). Verteporfin-induced formation of protein cross-linked oligomers and high molecular weight complexes is mediated by light and leads to cell toxicity. *Sci. Rep.* 7.
- Kruglov, E.A., Nathanson, R.A., Nguyen, T., and Dranoff, J.A. (2006). Secretion of MCP-1/CCL2 by bile duct epithelia induces myofibroblastic transdifferentiation of portal fibroblasts. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G765-771.
- Lackner, C., Spindelboeck, W., Haybaeck, J., Douschan, P., Rainer, F., Terracciano, L., Haas, J., Berghold, A., Bataller, R., and Stauber, R.E. (2017). Histological parameters and alcohol abstinence determine long-term prognosis in patients with alcoholic liver disease. *J. Hepatol.* 66, 610–618.
- Lai, Z.-C., Wei, X., Shimizu, T., Ramos, E., Rohrbaugh, M., Nikolaidis, N., Ho, L.-L., and Li, Y. (2005). Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell* 120, 675–685.
- Lanthier, N., Rubbia-Brandt, L., Lin-Marq, N., Clément, S., Frossard, J.-L., Goossens, N., Hadengue, A., and Spahr, L. (2015). Hepatic cell proliferation plays a pivotal role in the prognosis of alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.* 63, 609–621.
- Lau, L.F. (2016). Cell surface receptors for CCN proteins. *J. Cell Commun. Signal.* 10, 121–127.
- Lê S, Josse J, Husson F (2008). An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25: 1-18.
- Lee, D.-H., Park, J.O., Kim, T.-S., Kim, S.-K., Kim, T.-H., Kim, M.-C., Park, G.S., Kim, J.-H., Kuninaka, S., Olson, E.N., et al. (2016). LATS-YAP/TAZ controls lineage specification by regulating TGFβ signaling and Hnf4α expression during liver development. *Nat. Commun.* 7, 11961.
- Leliefeld, P.H.C., Koenderman, L., and Pillay, J. (2015). How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses. *Front. Immunol.* 6, 471.
- Levy, D., Adamovich, Y., Reuven, N., and Shaul, Y. (2008). Yap1 phosphorylation by c-Abl is a critical step in selective activation of proapoptotic genes in response to DNA damage. *Mol. Cell* 29, 350–361.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689.
- Li, A.K.C. (1999). Grey Turner Memorial Lecture. Changing Role of Liver Surgeons. *World J. Surg.* 23, 1–5.
- Li, H., Wolfe, A., Septer, S., Edwards, G., Zhong, X., Abdulkarim, A.B., Ranganathan, S., and Apte, U. (2012). Deregulation of Hippo kinase signalling in human hepatic malignancies. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 32, 38–47.
- Li, J., Xin, J., Zhang, L., Wu, J., Jiang, L., Zhou, Q., Li, J., Guo, J., Cao, H., and Li, L. (2014). Human hepatic progenitor cells express hematopoietic cell markers CD45 and CD109. *Int. J. Med. Sci.* 11, 65–79.
- Li, M., He, Y., Zhou, Z., Ramirez, T., Gao, Y., Gao, Y., Ross, R.A., Cao, H., Cai, Y., Xu, M., et al. (2017). MicroRNA-223 ameliorates alcoholic liver injury by inhibiting the IL-6–p47phox–oxidative stress pathway in neutrophils. *Gut* 66, 705–715.

Li, P., Chen, Y., Mak, K.K., Wong, C.K., Wang, C.C., and Yuan, P. (2013). Functional role of Mst1/Mst2 in embryonic stem cell differentiation. *PLoS One* 8, e79867.

Lian, I., Kim, J., Okazawa, H., Zhao, J., Zhao, B., Yu, J., Chinnaiyan, A., Israel, M.A., Goldstein, L.S.B., Abujarour, R., et al. (2010). The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* 24, 1106–1118.

Liang, M., Yu, M., Xia, R., Song, K., Wang, J., Luo, J., Chen, G., and Cheng, J. (2017). Yap/Taz Deletion in Gli+ Cell-Derived Myofibroblasts Attenuates Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 28, 3278–3290.

Lieber, C.S. (2004). Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol Fayettev. N* 34, 9–19.

Liew, P.X., and Kubes, P. (2019a). The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol. Rev.* 99, 1223–1248.

Liew, P.X., and Kubes, P. (2019b). The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol. Rev.* 99, 1223–1248.

Liu, F., Lagares, D., Choi, K.M., Stopfer, L., Marinković, A., Vrbanac, V., Probst, C.K., Hiemer, S.E., Sisson, T.H., Horowitz, J.C., et al. (2015). Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 308, L344-357.

Liu, Y., Lu, T., Zhang, C., Xu, J., Xue, Z., Busuttill, R.W., Xu, N., Xia, Q., Kupiec-Weglinski, J.W., and Ji, H. (2019). Activation of YAP attenuates hepatic damage and fibrosis in liver ischemia-reperfusion injury. *J. Hepatol.* 71, 719–730.

Liu-Chittenden, Y., Huang, B., Shim, J.S., Chen, Q., Lee, S.-J., Anders, R.A., Liu, J.O., and Pan, D. (2012). Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev.* 26, 1300–1305.

Loforese, G., Malinka, T., Keogh, A., Baier, F., Simillion, C., Montani, M., Halazonetis, T.D., Candinas, D., and Stroka, D. (2017). Impaired liver regeneration in aged mice can be rescued by silencing Hippo core kinases MST1 and MST2. *EMBO Mol. Med.* 9, 46–60.

Lorenzini, S., Bird, T.G., Boulter, L., Bellamy, C., Samuel, K., Aucott, R., Clayton, E., Andreone, P., Bernardi, M., Golding, M., et al. (2010). Characterisation of a stereotypical cellular and extracellular adult liver progenitor cell niche in rodents and diseased human liver. *Gut* 59, 645–654.

Louvet, A., and Mathurin, P. (2015). Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 231–242.

Louvet, A., Naveau, S., Abdelnour, M., Ramond, M.-J., Diaz, E., Fartoux, L., Dharancy, S., Texier, F., Hollebecque, A., Serfaty, L., et al. (2007). The Lille model: A new tool for therapeutic strategy in patients with severe alcoholic hepatitis treated with steroids. *Hepatology* 45, 1348–1354.

Louvet, A., Wartel, F., Castel, H., Dharancy, S., Hollebecque, A., Canva-Delcambre, V., Deltenre, P., and Mathurin, P. (2009). Infection in patients with severe alcoholic hepatitis treated with steroids: early response to therapy is the key factor. *Gastroenterology* 137, 541–548.

Louvet, A., Teixeira-Clerc, F., Chobert, M.-N., Deveaux, V., Pavoine, C., Zimmer, A., Pecker, F., Mallat, A., and Lotersztajn, S. (2011). Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. *Hepatology* 54, 1217–1226.

- Louvet, A., Thursz, M.R., Kim, D.J., Labreuche, J., Atkinson, S.R., Sidhu, S.S., O'Grady, J.G., Akriviadis, E., Sinakos, E., Carithers, R.L., et al. (2018). Corticosteroids Reduce Risk of Death Within 28 Days for Patients With Severe Alcoholic Hepatitis, Compared With Pentoxifylline or Placebo—a Meta-analysis of Individual Data From Controlled Trials. *Gastroenterology* *155*, 458-468.e8.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*, 550.
- Lu, Y., and Cederbaum, A.I. (2008). CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic. Biol. Med.* *44*, 723–738.
- Lu, W.-Y., Bird, T.G., Boulter, L., Tsuchiya, A., Cole, A.M., Hay, T., Guest, R.V., Wojtacha, D., Man, T.Y., Mackinnon, A., et al. (2015). Hepatic progenitor cells of biliary origin with liver repopulation capacity. *Nat. Cell Biol.* *17*, 971–983.
- Lucey, M.R., and Morgan, T.R. (2009). Alcoholic Hepatitis. *N Engl J Med* *12*.
- Lucey, M.R., Brown, K.A., Everson, G.T., Fung, J.J., Gish, R., Keeffe, E.B., Kneteman, N.M., Lake, J.R., Martin, P., McDiarmid, S.V., et al. (1997). Minimal criteria for placement of adults on the liver transplant waiting list: A report of a national conference organized by the American Society of Transplant Physicians and the American Association for the Study of Liver Diseases. *Liver Transpl. Surg.* *3*, 628–637.
- Lucey, M.R., Mathurin, P., and Morgan, T.R. (2009). Alcoholic hepatitis. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2758–2769.
- Luo, B., Tang, L., Wang, Z., Zhang, J., Ling, Y., Feng, W., Sun, J.-Z., Stockard, C.R., Frost, A.R., Chen, Y.-F., et al. (2005). Cholangiocyte endothelin 1 and transforming growth factor beta1 production in rat experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* *129*, 682–695.
- Maharam, E., Yaport, M., Villanueva, N.L., Akinyibi, T., Laudier, D., He, Z., Leong, D.J., and Sun, H.B. (2015). Rho/Rock signal transduction pathway is required for MSC tenogenic differentiation. *Bone Res.* *3*, 15015.
- Maher, J.J., Zia, S., and Tzagarakis, C. (1994). Acetaldehyde-induced stimulation of collagen synthesis and gene expression is dependent on conditions of cell culture: studies with rat lipocytes and fibroblasts. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *18*, 403–409.
- Makita, R., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Amano, T., Chen, Q., Takeuchi, T., Mitani, A., Nagase, T., Yatomi, Y., Aburatani, H., et al. (2008). Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *294*, F542-553.
- Mamdouh, Z., Mikhailov, A., and Muller, W.A. (2009). Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment. *J. Exp. Med.* *206*, 2795–2808.
- Mammoto, A., and Ingber, D.E. (2009). Cytoskeletal control of growth and cell fate switching. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 864–870.
- Mandrekar, P., Bataller, R., Tsukamoto, H., and Gao, B. (2016). Alcoholic hepatitis: Translational approaches to develop targeted therapies. *Hepatology* *64*, 1343–1355.

- Mannaerts, I., Leite, S.B., Verhulst, S., Claerhout, S., Eysackers, N., Thoen, L.F.R., Hoorens, A., Reynaert, H., Halder, G., and van Grunsven, L.A. (2015). The Hippo pathway effector YAP controls mouse hepatic stellate cell activation. *J. Hepatol.* *63*, 679–688.
- Marra, F., Valente, A.J., Pinzani, M., and Abboud, H.E. (1993). Cultured human liver fat-storing cells produce monocyte chemotactic protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines. *J. Clin. Invest.* *92*, 1674–1680.
- Marra, F., DeFranco, R., Grappone, C., Parola, M., Milani, S., Leonarduzzi, G., Pastacaldi, S., Wenzel, U.O., Pinzani, M., Dianzani, M.U., et al. (1999). Expression of monocyte chemotactic protein-1 precedes monocyte recruitment in a rat model of acute liver injury, and is modulated by vitamin E. *J. Invest. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* *47*, 66–75.
- Marth, T., Strober, W., Seder, R.A., and Kelsall, B.L. (1997). Regulation of transforming growth factor-beta production by interleukin-12. *Eur. J. Immunol.* *27*, 1213–1220.
- Martin marcel, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMB-Netjournal* *17*, 10–12.
- Mathurin, P., Mendenhall, C.L., Carithers, R.L., Ramond, M.-J., Maddrey, W.C., Garstide, P., Rueff, B., Naveau, S., Chaput, J.-C., and Poynard, T. (2002). Corticosteroids improve short-term survival in patients with severe alcoholic hepatitis (AH): individual data analysis of the last three randomized placebo controlled double blind trials of corticosteroids in severe AH. *J. Hepatol.* *36*, 480–487.
- Mathurin, P., Beuzin, F., Louvet, A., Carrié-Ganne, N., Balian, A., Trinchet, J.C., Dalsoglio, D., Prevot, S., and Naveau, S. (2007). Fibrosis progression occurs in a subgroup of heavy drinkers with typical histological features: FIBROSIS PROGRESSION IN HEAVY DRINKERS. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *25*, 1047–1054.
- Mathurin, P., Samuel, D., Durand, F., Pageaux, G.-P., Dharancy, S., Boleslawski, E., Francoz, C., Belghiti, J., and Pruvot, F.-R. (2011). Early Liver Transplantation for Severe Alcoholic Hepatitis. *N Engl J Med* *11*.
- Matsuoka, M., and Tsukamoto, H. (1990). Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatol. Baltim. Md* *11*, 599–605.
- McDaniell, R., Warthen, D.M., Sanchez-Lara, P.A., Pai, A., Krantz, I.D., Piccoli, D.A., and Spinner, N.B. (2006). NOTCH2 Mutations Cause Alagille Syndrome, a Heterogeneous Disorder of the Notch Signaling Pathway. *Am. J. Hum. Genet.* *79*, 169–173.
- Mead, J.E., and Fausto, N. (1989). Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 1558–1562.
- Meijer, C., Wiezer, M.J., Diehl, A.M., Schouten, H.J., Schouten, H.J., Meijer, S., van Rooijen, N., van Lambalgen, A.A., Dijkstra, C.D., and van Leeuwen, P.A. (2000). Kupffer cell depletion by CI2MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver* *20*, 66–77.
- Menjo, M., Ikeda, K., and Nakanishi, M. (1998). Regulation of G<sub>1</sub> cyclin-dependent kinases in liver regeneration. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *13*, S100–S105.



- Mestas, J., and Hughes, C.C.W. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *172*, 2731–2738.
- Michalopoulos, G.K. (2012). Phenotypic fidelity (or not?) of epithelial cells in the liver. *Hepatology* *55*, 2024–2027.
- Michalopoulos, G.K. (2014). Advances in liver regeneration. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *8*, 897–907.
- Michalopoulos, G.K. (2017). Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology. Baltim. Md* *65*, 1384–1392.
- Michalopoulos, G.K., and Khan, Z. (2005). Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. *Gastroenterology* *128*, 503–506.
- Michalopoulos, G.K., and Khan, Z. (2015). Liver stem cells: Experimental findings and implications for human liver disease. *Gastroenterology* *149*, 876–882.
- Michalopoulos, G.K., Bowen, W.C., Mulè, K., and Stolz, D.B. (2001). Histological Organization in Hepatocyte Organoid Cultures. *Am. J. Pathol.* *159*, 1877–1887.
- Michalopoulos, G.K., Barua, L., and Bowen, W.C. (2005). Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury. *Hepatology* *41*, 535–544.
- Mikton, C.R., Butchart, A., Dahlberg, L.L., and Krug, E.G. (2016). Global Status Report on Violence Prevention 2014. *Am. J. Prev. Med.* *50*, 652–659.
- Miller, E., Yang, J., DeRan, M., Wu, C., Su, A.I., Bonamy, G.M.C., Liu, J., Peters, E.C., and Wu, X. (2012). Identification of serum-derived sphingosine-1-phosphate as a small molecule regulator of YAP. *Chem. Biol.* *19*, 955–962.
- Mitchell, C., Couton, D., Couty, J.-P., Anson, M., Crain, A.-M., Bizet, V., Rénia, L., Pol, S., Mallet, V., and Gilgenkrantz, H. (2009). Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice. *Am. J. Pathol.* *174*, 1766–1775.
- Miyajima, A., Tanaka, M., and Itoh, T. (2014). Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell* *14*, 561–574.
- Miyake, K., and Onji, M. (2013). Endocytosis-free DNA sensing by cell surface TLR9 in neutrophils: rapid defense with autoimmune risks. *Eur. J. Immunol.* *43*, 2006–2009.
- Mo, J.-S., Yu, F.-X., Gong, R., Brown, J.H., and Guan, K.-L. (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by protease-activated receptors (PARs). *Genes Dev.* *26*, 2138–2143.
- Mookerjee, R.P., Stadlbauer, V., Lidder, S., Wright, G.A.K., Hodges, S.J., Davies, N.A., and Jalan, R. (2007). Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *Hepatology. Baltim. Md* *46*, 831–840.
- Mooring, M., Fowl, B.H., Lum, S.Z.C., Liu, Y., Yao, K., Softic, S., Kirchner, R., Bernstein, A., Singhi, A.D., Jay, D.G., et al. (2019). Hepatocyte Stress Increases Expression of YAP and TAZ in Hepatocytes to Promote Parenchymal Inflammation and Fibrosis. *Hepatology. Baltim. Md.*

- Morin-Kensicki, E.M., Boone, B.N., Howell, M., Stonebraker, J.R., Teed, J., Alb, J.G., Magnuson, T.R., O'Neal, W., and Milgram, S.L. (2006). Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of Yap65. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 77–87.
- Moya, I.M., and Halder, G. (2016). The Hippo pathway in cellular reprogramming and regeneration of different organs. *Curr. Opin. Cell Biol.* *43*, 62–68.
- Muller, W.A. (2013). Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Vet. Pathol.* *50*, 7–22.
- Mura, V.L. (2015). Cirrhosis and portal hypertension: The importance of risk stratification, the role of hepatic venous pressure gradient measurement. *World J. Hepatol.* *7*, 688.
- Mutlu, E.A., Gillevet, P.M., Rangwala, H., Sikaroodi, M., Naqvi, A., Engen, P.A., Kwasny, M., Lau, C.K., and Keshavarzian, A. (2012). Colonic microbiome is altered in alcoholism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *302*, G966–978.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 173–182.
- Naveau, S., Giraud, V., Borotto, E., Aubert, A., Capron, F., and Chaput, J. (1997). Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology* *25*, 108–111.
- Neuman, M.G., Shear, N.H., Bellentani, S., and Tiribelli, C. (1998). Role of cytokines in ethanol-induced cytotoxicity in vitro in Hep G2 cells. *Gastroenterology* *115*, 157–166.
- Nishio, M., Sugimachi, K., Goto, H., Wang, J., Morikawa, T., Miyachi, Y., Takano, Y., Hikasa, H., Itoh, T., Suzuki, S.O., et al. (2016). Dysregulated YAP1/TAZ and TGF- $\beta$  signaling mediate hepatocarcinogenesis in *Mob1a/1b*-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, E71–E80.
- Nourshargh, S., Krombach, F., and Dejana, E. (2006). The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 714–718.
- Oboki, K., Ohno, T., Kajiwara, N., Saito, H., and Nakae, S. (2010). IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.* *59*, 143–160.
- Oda, T., Elkahoul, A.G., Pike, B.L., Okajima, K., Krantz, I.D., Genin, A., Piccoli, D.A., Meltzer, P.S., Spinner, N.B., Collins, F.S., et al. (1997). Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat. Genet.* *16*, 235–242.
- Oh, H., and Irvine, K.D. (2008). In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 1081–1088.
- Oka, T., and Sudol, M. (2009). Nuclear localization and pro-apoptotic signaling of YAP2 require intact PDZ-binding motif. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *14*, 607–615.
- Oka, T., Remue, E., Meerschaert, K., Vanloo, B., Boucherie, C., Gfeller, D., Bader, G.D., Sidhu, S.S., Vandekerckhove, J., Gettemans, J., et al. (2010). Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochem. J.* *432*, 461–472.
- Oka, T., Schmitt, A.P., and Sudol, M. (2012). Opposing roles of angiotensin-like-1 and zona occludens-2 on pro-apoptotic function of YAP. *Oncogene* *31*, 128–134.

- Okabe, M., Tsukahara, Y., Tanaka, M., Suzuki, K., Saito, S., Kamiya, Y., Tsujimura, T., Nakamura, K., and Miyajima, A. (2009). Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 1951–1960.
- Oliveira, T.H.C. de, Marques, P.E., Proost, P., and Teixeira, M.M.M. (2018). Neutrophils: a cornerstone of liver ischemia and reperfusion injury. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *98*, 51–62.
- Orlova, V.V., Economopoulou, M., Lupu, F., Santoso, S., and Chavakis, T. (2006). Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VE-cadherin-mediated cell-cell contacts. *J. Exp. Med.* *203*, 2703–2714.
- Ou, C., Sun, Z., Li, S., Li, G., Li, X., and Ma, J. (2017). Dual roles of yes-associated protein (YAP) in colorectal cancer. *Oncotarget* *8*, 75727–75741.
- Ozaki, M., Haga, S., Zhang, H.Q., Irani, K., and Suzuki, S. (2003). Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in HGF-stimulated antiapoptotic signaling: role of PI3-K and Akt kinase upon rac1. *Cell Death Differ.* *10*, 508–515.
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* *19*, 491–505.
- Pantalacci, S., Tapon, N., and Léopold, P. (2003). The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* *5*, 921–927.
- Park, H.W., Kim, Y.C., Yu, B., Moroishi, T., Mo, J.-S., Plouffe, S.W., Meng, Z., Lin, K.C., Yu, F.-X., Alexander, C.M., et al. (2015). Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell* *162*, 780–794.
- Patel, S., Camargo, F.D., and Yimlamai, D. (2017a). Hippo Signaling in the Liver Regulates Organ Size, Cell Fate, and Carcinogenesis. *Gastroenterology* *152*, 533–545.
- Patel, S.H., Camargo, F.D., and Yimlamai, D. (2017b). Hippo Signaling in the Liver Regulates Organ Size, Cell Fate, and Carcinogenesis. *Gastroenterology* *152*, 533–545.
- Pei, C., Barbour, M., Fairlie-Clarke, K.J., Allan, D., Mu, R., and Jiang, H.-R. (2014). Emerging role of interleukin-33 in autoimmune diseases. *Immunology* *141*, 9–17.
- Peng, Y., Li, Y., He, Y., Wei, Q., Xie, Q., Zhang, L., Xia, Y., Zhou, X., Zhang, L., Feng, X., et al. (2018). The role of neutrophil to lymphocyte ratio for the assessment of liver fibrosis and cirrhosis: a systematic review. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 503–513.
- Petri, B., Phillipson, M., and Kubes, P. (2008). The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 6439–6446.
- Phillipson, M., and Kubes, P. (2011). The neutrophil in vascular inflammation. *Nat. Med.* *17*, 1381–1390.
- Phillipson, M., Kaur, J., Colarusso, P., Ballantyne, C.M., and Kubes, P. (2008). Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PLoS One* *3*, e1649.
- Piccolo, S., Dupont, S., and Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* *94*, 1287–1312.

- Pillay, J., Hietbrink, F., Koenderman, L., and Leenen, L.P.H. (2007). The systemic inflammatory response induced by trauma is reflected by multiple phenotypes of blood neutrophils. *Injury* 38, 1365–1372.
- Pradere, J.-P., Kluwe, J., Minicis, S.D., Jiao, J.-J., Gwak, G.-Y., Dapito, D.H., Jang, M.-K., Guenther, N.D., Mederacke, I., Friedman, R., et al. (2013). Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* 58, 1461–1473.
- Pruenster, M., Mudde, L., Bombosi, P., Dimitrova, S., Zsak, M., Middleton, J., Richmond, A., Graham, G.J., Segerer, S., Nibbs, R.J.B., et al. (2009). The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat. Immunol.* 10, 101–108.
- Purohit, V., Gao, B., and Song, B.-J. (2009). Molecular Mechanisms of Alcoholic Fatty Liver. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 33, 191–205.
- Qin, H., Hejna, M., Liu, Y., Percharde, M., Wossidlo, M., Blouin, L., Durruthy-Durruthy, J., Wong, P., Qi, Z., Yu, J., et al. (2016). YAP Induces Human Naïve Pluripotency. *Cell Rep.* 14, 2301–2312.
- Quinn, J., Kunath, T., and Rossant, J. (2006). Mouse trophoblast stem cells. *Methods Mol. Med.* 121, 125–148.
- Ramachandran, P., Pellicoro, A., Vernon, M.A., Boulter, L., Aucott, R.L., Ali, A., Hartland, S.N., Snowdon, V.K., Cappon, A., Gordon-Walker, T.T., et al. (2012). Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E3186–3195.
- Ramaiah, S.K., and Jaeschke, H. (2007). Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Acute Inflammatory Liver Injury. *Toxicol. Pathol.* 35, 757–766.
- Ramos, A., and Camargo, F.D. (2012). The Hippo signaling pathway and stem cell biology. *Trends Cell Biol.* 22, 339–346.
- Rehm, J., Taylor, B., Mohapatra, S., Irving, H., Baliunas, D., Patra, J., and Roerecke, M. (2010). Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: A systematic review and meta-analysis: Alcohol and liver cirrhosis. *Drug Alcohol Rev.* 29, 437–445.
- Remue, E., Meerschaert, K., Oka, T., Boucherie, C., Vandekerckhove, J., Sudol, M., and Gettemans, J. (2010). TAZ interacts with zonula occludens-1 and -2 proteins in a PDZ-1 dependent manner. *FEBS Lett.* 584, 4175–4180.
- Riehle, K.J., Campbell, J.S., McMahan, R.S., Johnson, M.M., Beyer, R.P., Bammler, T.K., and Fausto, N. (2008). Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signaling 3. *J. Exp. Med.* 205, 91–103.
- Rodrigo-Torres, D., Affò, S., Coll, M., Morales-Ibanez, O., Millán, C., Blaya, D., Alvarez-Guaita, A., Rentero, C., Lozano, J.J., Maestro, M.A., et al. (2014). The biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells: RODRIGO-TORRES ET AL. *Hepatology* 60, 1367–1377.
- Roger, T., and Calandra, T. (2010). Interleukin-33 safeguards neutrophils in sepsis. *Nat. Med.* 16, 638–639.

Roskams, T., Yang, S.Q., Koteish, A., Durnez, A., DeVos, R., Huang, X., Achten, R., Verslype, C., and Diehl, A.M. (2003). Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Pathol.* *163*, 1301–1311.

Rountree, C.B., Barsky, L., Ge, S., Zhu, J., Senadheera, S., and Crooks, G.M. (2007). A CD133-expressing murine liver oval cell population with bilineage potential. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 2419–2429.

Ruddell, R.G., Knight, B., Tirnitz-Parker, J.E.E., Akhurst, B., Summerville, L., Subramaniam, V.N., Olynyk, J.K., and Ramm, G.A. (2009). Lymphotoxin-beta receptor signaling regulates hepatic stellate cell function and wound healing in a murine model of chronic liver injury. *Hepatology. Baltim. Md* *49*, 227–239.

Sadik, C.D., Kim, N.D., and Luster, A.D. (2011). Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* *32*, 452–460.

Sancho-Bru, P., Altamirano, J., Rodrigo-Torres, D., Coll, M., Millán, C., José Lozano, J., Miquel, R., Arroyo, V., Caballería, J., Ginès, P., et al. (2012). Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology* *55*, 1931–1941.

Sansores-Garcia, L., Bossuyt, W., Wada, K.-I., Yonemura, S., Tao, C., Sasaki, H., and Halder, G. (2011). Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *EMBO J.* *30*, 2325–2335.

Santinon, G., Pocaterra, A., and Dupont, S. (2016). Control of YAP/TAZ Activity by Metabolic and Nutrient-Sensing Pathways. *Trends Cell Biol.* *26*, 289–299.

Sanz, M.-J., and Kubes, P. (2012). Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. *Eur. J. Immunol.* *42*, 278–283.

Sarraf, C., Lalani, E.N., Golding, M., Anilkumar, T.V., Poulson, R., and Alison, M. (1994). Cell behavior in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. Light and electron microscopic observations. *Am. J. Pathol.* *145*, 1114–1126.

Sarris, M., Masson, J.-B., Maurin, D., Van der Aa, L.M., Boudinot, P., Lortat-Jacob, H., and Herbomel, P. (2012). Inflammatory chemokines direct and restrict leukocyte migration within live tissues as glycan-bound gradients. *Curr. Biol. CB* *22*, 2375–2382.

Schaper, F., and Rose-John, S. (2015). Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev.* *26*, 475–487.

Schaub, J.R., Malato, Y., Gormond, C., and Willenbring, H. (2014). Evidence against a Stem Cell Origin of New Hepatocytes in a Common Mouse Model of Chronic Liver Injury. *Cell Rep.* *8*, 933–939.

Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszk, J., Rodriguez, J.R., Zhou, D., Kreger, B.T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T.R., et al. (2011). Yap1 acts downstream of  $\alpha$ -catenin to control epidermal proliferation. *Cell* *144*, 782–795.

Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., et al. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* *23*, 479–490.

- Seitz, H.K., Bataller, R., Cortez-Pinto, H., Gao, B., Gual, A., Lackner, C., Mathurin, P., Mueller, S., Szabo, G., and Tsukamoto, H. (2018). Alcoholic liver disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* 4.
- Sekiya, S., and Suzuki, A. (2014). Hepatocytes, Rather than Cholangiocytes, Can Be the Major Source of Primitive Ductules in the Chronically Injured Mouse Liver. *Am. J. Pathol.* 184, 1468–1478.
- Selders, G.S., Fetz, A.E., Radic, M.Z., and Bowlin, G.L. (2017). An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regen. Biomater.* 4, 55–68.
- Selzner, N., Selzner, M., Odermatt, B., Tian, Y., Van Rooijen, N., and Clavien, P.-A. (2003). ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF- $\alpha$ /IL-6 in mice. *Gastroenterology* 124, 692–700.
- Shaw, S.K., Ma, S., Kim, M.B., Rao, R.M., Hartman, C.U., Froio, R.M., Yang, L., Jones, T., Liu, Y., Nusrat, A., et al. (2004). Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. *J. Exp. Med.* 200, 1571–1580.
- Sheth, M., Riggs, M., and Patel, T. (2002). Utility of the Mayo End-Stage Liver Disease (MELD) score in assessing prognosis of patients with alcoholic hepatitis. *BMC Gastroenterol.* 2.
- Shi, Z.-R., Yan, L.-N., Li, B., and Wen, T.-F. (2009). Evaluation of standard liver volume formulae for Chinese adults. *World J. Gastroenterol.* 15, 3462.
- Shimizu, M., Hara, A., Okuno, M., Matsuno, H., Okada, K., Ueshima, S., Matsuo, O., Niwa, M., Akita, K., Yamada, Y., et al. (2001). Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis. *Hepatology* 33, 569–576.
- Shiple, L.C., Kodali, S., and Singal, A.K. (2019). Recent updates on alcoholic hepatitis. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 51, 761–768.
- Silvestre-Roig, C., Hidalgo, A., and Soehnlein, O. (2016). Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood* 127, 2173–2181.
- Silvis, M.R., Kreger, B.T., Lien, W.-H., Klezovitch, O., Rudakova, G.M., Camargo, F.D., Lantz, D.M., Seykora, J.T., and Vasioukhin, V. (2011).  $\alpha$ -catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Sci. Signal.* 4, ra33.
- Singal, A.K., Kodali, S., Vucovich, L.A., Darley-Usmar, V., and Schiano, T.D. (2016). Diagnosis and Treatment of Alcoholic Hepatitis: A Systematic Review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 40, 1390–1402.
- Singal, A.K., Louvet, A., Shah, V.H., and Kamath, P.S. (2018). Grand Rounds: Alcoholic Hepatitis. *J. Hepatology* 69, 534–543.
- Skov Olsen, P., Boesby, S., Kirkegaard, P., Therkelsen, K., Almdal, T., Poulsen, S.S., and Nexø, E. (1988). Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 8, 992–996.
- Smyth, G. K. (1998). Optimization and nonlinear equations. In *Encyclopedia of Biostatistics*, P. Armitage, and T. Colton, eds. (London: Wiley), pp. 3174–3180.

- Song, S., Xie, M., Scott, A.W., Jin, J., Ma, L., Dong, X., Skinner, H.D., Johnson, R.L., Ding, S., and Ajani, J.A. (2018). A Novel YAP1 Inhibitor Targets CSC-Enriched Radiation-Resistant Cells and Exerts Strong Antitumor Activity in Esophageal Adenocarcinoma. *Mol. Cancer Ther.* *17*, 443–454.
- Song, Z., Gupta, K., Ng, I.C., Xing, J., Yang, Y.A., and Yu, H. (2017). Mechanosensing in liver regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* *71*, 153–167.
- Sorrentino, G., Ruggeri, N., Specchia, V., Cordenonsi, M., Mano, M., Dupont, S., Manfrin, A., Ingallina, E., Sommaggio, R., Piazza, S., et al. (2014). Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nat. Cell Biol.* *16*, 357–366.
- Spinelli, L., Carpentier, S., Montañana Sanchis, F., Dalod, M., and Vu Manh, T.-P. (2015). BubbleGUM: automatic extraction of phenotype molecular signatures and comprehensive visualization of multiple Gene Set Enrichment Analyses. *BMC Genomics* *16*.
- Stadlbauer, V., Mookerjee, R.P., Wright, G.A.K., Davies, N.A., Jürgens, G., Hallström, S., and Jalan, R. (2009). Role of Toll-like receptors 2, 4, and 9 in mediating neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *296*, G15–G22.
- Stark, K., Eckart, A., Haidari, S., Tirniceriu, A., Lorenz, M., von Brühl, M.-L., Gärtner, F., Khandoga, A.G., Legate, K.R., Pless, R., et al. (2013). Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and “instruct” them with pattern-recognition and motility programs. *Nat. Immunol.* *14*, 41–51.
- Strazzabosco, M., and Fabris, L. (2013). The balance between Notch/Wnt signaling regulates progenitor cells’ commitment during liver repair: mystery solved? *J. Hepatol.* *58*, 181–183.
- Strey, C.W., Markiewski, M., Mastellos, D., Tudoran, R., Spruce, L.A., Greenbaum, L.E., and Lambris, J.D. (2003). The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J. Exp. Med.* *198*, 913–923.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 15545–15550.
- Sudol, M. (1994). Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. *Oncogene* *9*, 2145–2152.
- Sudol, M., and Harvey, K.F. (2010). Modularity in the Hippo signaling pathway. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 627–633.
- Sudol, M., Bork, P., Einbond, A., Kastury, K., Druck, T., Negrini, M., Huebner, K., and Lehman, D. (1995). Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *J. Biol. Chem.* *270*, 14733–14741.
- Sudol, M., Shields, D.C., and Farooq, A. (2012). Structures of YAP protein domains reveal promising targets for development of new cancer drugs. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*, 827–833.
- Sunami, Y., Leithäuser, F., Gul, S., Fiedler, K., Güldiken, N., Espenlaub, S., Holzmann, K.-H., Hipp, N., Sindrilaru, A., Luedde, T., et al. (2012). Hepatic activation of IKK/NFκB signaling induces liver fibrosis via macrophage-mediated chronic inflammation. *Hepatol. Baltim. Md* *56*, 1117–1128.

- Suzuki, A., Sekiya, S., Onishi, M., Oshima, N., Kiyonari, H., Nakauchi, H., and Taniguchi, H. (2008). Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *Hepatology*. Baltimore, Md 48, 1964–1978.
- Tacke, F., and Zimmermann, H.W. (2014). Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J. Hepatology*. 60, 1090–1096.
- Taimr, P., Higuchi, H., Kocova, E., Rippe, R.A., Friedman, S., and Gores, G.J. (2003). Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology*. Baltimore, Md 37, 87–95.
- Tak, T., Wijten, P., Heeres, M., Pickkers, P., Scholten, A., Heck, A.J.R., Vrisekoop, N., Leenen, L.P., Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., et al. (2017). Human CD62Ldim neutrophils identified as a separate subset by proteome profiling and in vivo pulse-chase labeling. *Blood* 129, 3476–3485.
- Takamura, K., Tsuchida, K., Miyake, H., Tashiro, S., and Sugino, H. (2005). Activin and Activin Receptor Expression Changes in Liver Regeneration in Rat. *J. Surg. Res.* 126, 3–11.
- Tao, Y., Wang, M., Chen, E., and Tang, H. (2017). Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules. *Mediators Inflamm.* 2017, 1–9.
- Tapon, N., Harvey, K.F., Bell, D.W., Wahrer, D.C.R., Schiripo, T.A., Haber, D.A., and Hariharan, I.K. (2002). *salvador* Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* 110, 467–478.
- Tarlow, B.D., Finegold, M.J., and Grompe, M. (2014). Clonal tracing of Sox9<sup>+</sup> liver progenitors in mouse oval cell injury. *Hepatology* 60, 278–289.
- Thursz, M., Gual, A., Lackner, C., Mathurin, P., Moreno, C., Spahr, L., Sterneck, M., and Cortez-Pinto, H. (2018). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of alcohol-related liver disease. *J. Hepatology*. 69, 154–181.
- Tilg, H., and Moschen, A.R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. Baltimore, Md 52, 1836–1846.
- Timchenko, N.A. (2009). Aging and liver regeneration. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 20, 171–176.
- Tiniakos, D.G. (2009). Liver biopsy in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis patients. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 33, 930–939.
- Tsuchida, T., and Friedman, S.L. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 397–411.
- Van Hul, N.K.M., Abarca-Quinones, J., Sempoux, C., Horsmans, Y., and Leclercq, I.A. (2009). Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular matrix deposition in a CDE-induced murine model of chronic liver injury. *Hepatology*. Baltimore, Md 49, 1625–1635.
- Varelas, X., and Wrana, J.L. (2012). Coordinating developmental signaling: novel roles for the Hippo pathway. *Trends Cell Biol.* 22, 88–96.
- Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B.G., Rossant, J., and Wrana, J.L. (2010). The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF- $\beta$ -SMAD pathway. *Dev. Cell* 19, 831–844.



- Vassilev, A., Kaneko, K.J., Shu, H., Zhao, Y., and DePamphilis, M.L. (2001). TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev.* *15*, 1229–1241.
- Verhulst, S., Roskams, T., Sancho-Bru, P., and van Grunsven, L.A. (2019). Meta-Analysis of Human and Mouse Biliary Epithelial Cell Gene Profiles. *Cells* *8*.
- Villanueva, A., Alsinet, C., Yanger, K., Hoshida, Y., Zong, Y., Toffanin, S., Rodriguez-Carunchio, L., Solé, M., Thung, S., Stanger, B.Z., et al. (2012). Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice. *Gastroenterology* *143*, 1660-1669.e7.
- Viñas, O., Bataller, R., Sancho-Bru, P., Ginès, P., Berenguer, C., Enrich, C., Nicolás, J.M., Ercilla, G., Gallart, T., Vives, J., et al. (2003). Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* *38*, 919–929.
- Volckaert, T., Yuan, T., Chao, C.-M., Bell, H., Sitaula, A., Szymtenings, L., El Agha, E., Chanda, D., Majka, S., Bellusci, S., et al. (2017). Fgf10-Hippo Epithelial-Mesenchymal Crosstalk Maintains and Recruits Lung Basal Stem Cells. *Dev. Cell* *43*, 48-59.e5.
- Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., and Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 3907–3914.
- Wang, B., Zhao, L., Fish, M., Logan, C.Y., and Nusse, R. (2015a). Self-renewing diploid Axin2<sup>+</sup> cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature* *524*, 180–185.
- Wang, G., Lu, X., Dey, P., Deng, P., Wu, C.C., Jiang, S., Fang, Z., Zhao, K., Konaparthi, R., Hua, S., et al. (2016a). Targeting YAP-Dependent MDSC Infiltration Impairs Tumor Progression. *Cancer Discov.* *6*, 80–95.
- Wang, W., Xiao, Z.-D., Li, X., Aziz, K.E., Gan, B., Johnson, R.L., and Chen, J. (2015b). AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nat. Cell Biol.* *17*, 490–499.
- Wang, X., Zheng, Z., Caviglia, J.M., Corey, K.E., Herfel, T.M., Masia, R., Chung, R., Lefkowitz, J.H., Schwabe, R.F., and Tabas, I. (2016b). Hepatocyte TAZ/WWTR1 Promotes Inflammation and Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cell Metab.* *24*, 848–862.
- Wang, Z., Wu, Y., Wang, H., Zhang, Y., Mei, L., Fang, X., Zhang, X., Zhang, F., Chen, H., Liu, Y., et al. (2014). Interplay of mevalonate and Hippo pathways regulates RHAMM transcription via YAP to modulate breast cancer cell motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E89-98.
- Webber, E.M., Bruix, J., Pierce, R.H., and Fausto, N. (1998). Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology* *28*, 1226–1234.
- Weiss, S.J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* *320*, 365–376.
- Williams, M.R., Azcutia, V., Newton, G., Alcaide, P., and Luscinskas, F.W. (2011). Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol.* *32*, 461–469.
- Woodfin, A., Voisin, M.-B., Imhof, B.A., Dejana, E., Engelhardt, B., and Nourshargh, S. (2009). Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood* *113*, 6246–6257.

- Wu, S., Huang, J., Dong, J., and Pan, D. (2003). hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* *114*, 445–456.
- Wüstefeld, T., Rakemann, T., Kubicka, S., Manns, M.P., and Trautwein, C. (2000). Hyperstimulation with interleukin 6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice. *Hepatology* *32*, 514–522.
- Wynn, T.A., Cheever, A.W., Jankovic, D., Poindexter, R.W., Caspar, P., Lewis, F.A., and Sher, A. (1995). An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature* *376*, 594–596.
- Xiao, H., Jiang, N., Zhou, B., Liu, Q., and Du, C. (2015). TAZ regulates cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* *106*, 151–159.
- Xu, H., Turnquist, H.R., Hoffman, R., and Billiar, T.R. (2017). Role of the IL-33-ST2 axis in sepsis. *Mil. Med. Res.* *4*, 3.
- Xu, R., Huang, H., Zhang, Z., and Wang, F.-S. (2014). The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cell. Mol. Immunol.* *11*, 224–231.
- Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R.A., and Yu, W. (1995). Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Dev. Camb. Engl.* *121*, 1053–1063.
- Yagi, R., Chen, L.F., Shigesada, K., Murakami, Y., and Ito, Y. (1999). A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *EMBO J.* *18*, 2551–2562.
- Yang, L., Froio, R.M., Sciuto, T.E., Dvorak, A.M., Alon, R., and Luscinskas, F.W. (2005). ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood* *106*, 584–592.
- Yang, L., Wang, W.-H., Qiu, W.-L., Guo, Z., Bi, E., and Xu, C.-R. (2017). A single-cell transcriptomic analysis reveals precise pathways and regulatory mechanisms underlying hepatoblast differentiation. *Hepatology* *66*, 1387–1401.
- Yanger, K., Knigin, D., Zong, Y., Maggs, L., Gu, G., Akiyama, H., Pikarsky, E., and Stanger, B.Z. (2014). Adult Hepatocytes Are Generated by Self-Duplication Rather than Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell* *15*, 340–349.
- Yimlamai, D., Christodoulou, C., Galli, G.G., Yanger, K., Pepe-Mooney, B., Gurung, B., Shrestha, K., Cahan, P., Stanger, B.Z., and Camargo, F.D. (2014a). Hippo Pathway Activity Influences Liver Cell Fate. *Cell* *157*, 1324–1338.
- Yimlamai, D., Christodoulou, C., Galli, G.G., Yanger, K., Pepe-Mooney, B., Gurung, B., Shrestha, K., Cahan, P., Stanger, B.Z., and Camargo, F.D. (2014b). Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell* *157*, 1324–1338.
- Yin, M., Wheeler, M.D., Kono, H., Bradford, B.U., Gallucci, R.M., Luster, M.I., and Thurman, R.G. (1999). Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* *117*, 942–952.

You, M., Matsumoto, M., Pacold, C.M., Cho, W.K., and Crabb, D.W. (2004). The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver. *Gastroenterology* *127*, 1798–1808.

Yu, F.-X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J.L., Lian, I., Wang, L.H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., et al. (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* *150*, 780–791.

Zanconato, F., Forcato, M., Battilana, G., Azzolin, L., Quaranta, E., Bodega, B., Rosato, A., Bicciato, S., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2015). Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat. Cell Biol.* *17*, 1218–1227.

Zarbock, A., Ley, K., McEver, R.P., and Hidalgo, A. (2011). Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* *118*, 6743–6751.

Zeng, Q., and Hong, W. (2008). The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals. *Cancer Cell* *13*, 188–192.

Zhang, L., Ren, F., Zhang, Q., Chen, Y., Wang, B., and Jiang, J. (2008). The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev. Cell* *14*, 377–387.

Zhang, N., Bai, H., David, K.K., Dong, J., Zheng, Y., Cai, J., Giovannini, M., Liu, P., Anders, R.A., and Pan, D. (2010). The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Dev. Cell* *19*, 27–38.

Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., et al. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* *21*, 2747–2761.

Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.-Y., and Guan, K.-L. (2010). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev.* *24*, 72–85.

Zhao, B., Li, L., Wang, L., Wang, C.-Y., Yu, J., and Guan, K.-L. (2012). Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev.* *26*, 54–68.

Zhao, R., Fallon, T.R., Saladi, S.V., Pardo-Saganta, A., Villoria, J., Mou, H., Vinarsky, V., Gonzalez-Celeiro, M., Nunna, N., Hariri, L.P., et al. (2014). Yap tunes airway epithelial size and architecture by regulating the identity, maintenance, and self-renewal of stem cells. *Dev. Cell* *30*, 151–165.

## Résumé

L'hépatite alcoolique (HA) est une maladie complexe de mauvais pronostic. L'arsenal thérapeutique se limite souvent au traitement par corticoïde. Cependant, 40% des patients ne répondent pas au traitement et la transplantation hépatique est la dernière issue pour leur survie. L'HA est caractérisé par une importante infiltration de polynucléaires neutrophiles (PNN), et paradoxalement l'infection de ces patients est fréquente et liée à la mortalité. D'autre part, notre groupe a démontré un important défaut de régénération hépatique caractérisé par une diminution de la prolifération des hépatocytes dans l'HA. Le but de notre étude était de déterminer les mécanismes cellulaires à l'origine du défaut de régénération hépatique dans l'HA, d'explorer les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'interaction du PNN et de l'hépatocyte, et d'évaluer la capacité migratoire des PNN circulants au cours de l'HA.

Notre étude a mis en évidence la voie Hippo/YAP comme étant profondément altérée dans l'HA. L'activation de l'effecteur YAP était anormalement induite dans les hépatocytes de patients HA. Cette activation hépatocytaire induisait une dédifférenciation et une perte de fonctionnalité des hépatocytes. L'inhibition de YAP par la dobutamine dans des hépatocytes primaires isolés de patients HA était capable de limiter le processus de dédifférenciation. Ces données suggèrent que cibler YAP représente une stratégie thérapeutique innovante pour la prise en charge de l'HA. Nos travaux ont aussi permis d'identifier la voie NOD1 comme acteur principal dans l'interaction PNN/hépatocytes par le biais de l'expression de molécules d'adhésion. Nos résultats suggèrent cette voie comme cible thérapeutique pour limiter les lésions hépatiques induite par le PNN. De plus, au cours de l'HA, une dérégulation de la voie IL33/sST2 était impliquée dans la migration des PNN. Nous avons démontré une diminution de la capacité migratoire des PNN circulant au cours de l'HA. Le traitement des PNN par

l'IL33 était capable de compenser ce défaut migratoire, ce qui représente un outil intéressant pour prévenir les risques infectieux dans l'HA.

**Mots-clés :** Hépatite alcoolique, inflammation, PNN, NOD1, IL33/sST2, régénération, Hippo/YAP, et dédifférenciation.

## Abstract

Alcoholic hepatitis (AH) is a complex disease associated to a poor prognosis. The therapeutic arsenal is limited to corticosteroid treatment. However, 40% of patients do not respond to the treatment and liver transplantation represents the last option for their survival. AH is characterized by a large infiltration of polymorphonuclear neutrophils (PMN), and paradoxically the infection of these patients is a frequent event related to mortality. On the other hand, our group has demonstrated in AH an important defect of hepatic regeneration characterized by a decrease in hepatocytes proliferation, and the formation of ductular reaction. The aim of our study was to determine the cellular mechanisms causing the defect of liver regeneration in AH, to explore the pathophysiological mechanisms involved in the interaction of the PMN and hepatocytes, and to evaluate the migratory capacity of the PMN.

Our work has highlighted the Hippo/YAP pathway as profoundly altered during AH. The effector YAP was aberrantly activated in AH hepatocytes. This led to the dedifferentiation and the loss of function of hepatocytes. The treatment of AH-isolated hepatocytes by the YAP inhibitor, dobutamine, limited the dedifferentiation process. Targeting YAP appears as an innovative strategy for AH management. Our work also identified the NOD1 pathway as a major actor in the PNN/hepatocyte interaction through expression of adhesion molecules. Our results suggest that NOD1 is an interesting target to limit PMN-induced liver injury. In addition, during AH, deregulation of the IL33 / sST2 pathway was involved in PNN migration. We have demonstrated a decrease in the migratory capacity of circulating PMNs. The treatment of PMN by IL33 was able to compensate for this migratory defect, which represents an interesting tool to prevent infectious risks during AH.

**Keywords:** Alcoholic hepatitis, inflammation, PNN, NOD1, IL33/sST2, regeneration, Hippo / YAP, and dedifferentiation.