



HAL
open science

Les myofibroblastes portaux : fonction angiogénique et implication dans la progression de la fibrose hépatique

Sara Lemoinne Le Hecho

► **To cite this version:**

Sara Lemoinne Le Hecho. Les myofibroblastes portaux : fonction angiogénique et implication dans la progression de la fibrose hépatique. Médecine humaine et pathologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066252 . tel-01087196

HAL Id: tel-01087196

<https://theses.hal.science/tel-01087196>

Submitted on 25 Nov 2014

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 394 Physiologie Physiopathologie

Laboratoire INSERM UMR_S 938 / Equipe Chantal Housset

Les myofibroblastes portaux :
Fonction angiogénique et implication dans la
progression de la fibrose hépatique

Par Sara Lemoine

Dirigée par Dominique Thabut et Chantal Housset

Présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 2014

Devant un jury composé de :

M. Thierry JAFFREDO	Président
Mme Sophie LOTERSZTAJN	Rapporteur
M. José COURTY	Rapporteur
Mme Catherine MONNOT	Examineur
Mme Dominique THABUT	Directeur de thèse
Mme Chantal HOUSSET	Co-directeur de thèse

Remerciements

J'adresse mes remerciements à Sophie Lotersztajn et José Courty pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. J'associe à ces remerciements Thierry Jaffredo qui a accepté de présider ce jury de thèse.

Je remercie Catherine Monnot qui a parfaitement joué son rôle de tutrice pendant ma thèse en se montrant toujours disponible et attentive envers moi, notamment lors de notre séminaire à Chamonix, duquel je retiendrai nos échanges fructueux.

Je remercie chaleureusement Dominique Thabut qui m'a fait entrée dans le monde de la recherche en me confiant ce projet il y a quatre ans et qui depuis n'a cessé de faire preuve d'enthousiasme et d'optimisme tout au long de son encadrement.

Je remercie sincèrement Chantal Housset pour m'avoir accueillie dans son équipe et m'avoir guidée dans la réalisation de ce projet de recherche passionnant.

Je remercie toutes les personnes qui ont activement participé à ce travail et auprès desquelles j'ai beaucoup appris : Axelle Cadoret, Haquima El Mourabit, Colette Rey, Pierre-Emmanuel Rautou, Véronique Barbu, Dominique Wendum, Nelly Bosselut et Gérard Feldmann.

Je remercie également tous les membres de l'équipe INSERM UMR_S 938 qui m'ont accueillie au laboratoire et se sont toujours montrés patients et aimables à mon égard.

Abbréviations

α -sma : *alpha Smooth Muscle Actin*
BDL : *Bile Duct Ligation*
CBP : *Cirrhose Biliaire Primitive*
CCl4 : *Tétrachlorure de carbone*
CEF : *Cellule Etoilée du Foie*
CEF-MF : *Cellule Etoilée du Foie Myofibroblastique*
CK19 : *Cytokératine 19*
CSP : *Cholangite Sclérosante Primitive*
Col15a1 : *Collagène XV*
ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EPC : *Endothelial Progenitor Cell*
FGF : *Fibroblast Growth Factor*
GFAP : *Glial Fibrillary Acidic Protein*
HIF : *Hypoxia Inductible Factor*
HUVEC : *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*
Lrat : *Lécithine Rétinol AcylTransférase*
LSEC : *Liver Sinusoidal Endothelial Cell*
MFP : *Myofibroblastes Portaux*
MMP : *Matrix Metalloproteinase*
MP : *Microparticule*
NAFLD : *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*
NASH : *Non Alcoholic Steato-Hepatitis*
NRC : *Normal Rat Cholangiocyte*
PBC : *Primary Biliary Cirrhosis*
PDGF-BB : *Platelet-Derived Growth Factor-BB*
PIGF : *Placenta Growth Factor*
PMF : *Portal MyoFibroblast*
PS : *Phosphatidylsérine*
SVF : *Serum de Veau Fœtal*
TGF- β : *Transforming growth factor- β*

TF : *Tissue Factor*

TSEC : *Transformed Sinusoidal Endothelial Cell*

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFR : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

Sommaire

Introduction	7
Première partie: Introduction Bibliographique.....	9
I. Les myofibroblastes portaux	10
Préambule : rappels sur l'anatomie fonctionnelle du foie	10
1) Définitions et caractéristiques générales des myofibroblastes.....	12
2) Les différentes populations de myofibroblastes hépatiques.....	13
3) Les cellules étoilées du foie	15
4) Les myofibroblastes portaux	18
II. L'angiogenèse associée à la fibrogenèse hépatique.....	24
1) L'angiogenèse physiologique.....	24
2) Les méthodes d'étude de l'angiogenèse.....	30
3) L'angiogenèse pathologique	36
III. Les microparticules	44
1) Généralités: définitions, mode de formation et mécanismes d'action des microparticules	44
2) Méthodes d'étude des microparticules.....	48
3) Rôle des microparticules dans l'angiogenèse	50
4) Rôle des microparticules dans les maladies du foie.....	51
Deuxième Partie: Résultats des travaux	55
I. Caractérisation de notre modèle de MFP	56
1) Isolement des canaux biliaires	56
2) Culture des MFP	57
II. Le collagène XV est un bon marqueur des MFP.....	63
1) Identification du collagène XV par analyse du transcriptome	63
2) Expression du collagène XV par notre modèle cellulaire.....	64
3) Expression du Collagène XV par les autres cellules du foie	66

III. Rôle des MFP dans l'angiogenèse hépatique <i>in vivo</i>	70
1) Matériel et Méthodes.....	70
2) Expansion des MFP associée à l'angiogenèse aux stades de fibrose avancée	73
3) Distribution péri-vasculaire des MFP dans le foie cirrhotique	75
IV. Propriétés angiogéniques des MFP <i>in vitro</i>	82
1) Matériel et méthodes	82
2) Démonstration du pouvoir pro-angiogénique des MFP	87
3) Les microparticules comme médiateur de l'action pro-angiogénique des MFP	93
4) Facteurs favorisant le pouvoir angiogénique des MFP	97
 Troisième partie: Conclusions et perspectives	 112
I. Conclusions	113
II. Perspectives	116
 Bibliographie	 118
 Annexes	 127
Annexe 1 : Protocole d'isolement des canaux biliaires intra-hépatiques de rat	127
 Table des Figures.....	 133
 Tables des tableaux.....	 136
 Articles	 137
1) Revue sur les myofibroblastes hépatiques	138
2) Revue sur les microparticules dans les maladies du foie	145
3) Article original sur le rôle angiogénique des MFP	157

Introduction

Les maladies chroniques du foie constituent aujourd'hui un véritable enjeu de santé publique. Elles sont de plus en plus fréquentes, à la fois dans les pays en voie de développement dans lesquels la prévalence de l'hépatite B est importante mais également dans les pays occidentaux du fait de la prévalence élevée de l'hépatite C (environ 1% de la population), de la consommation excessive d'alcool et aussi de l'« épidémie » du syndrome métabolique exposant au risque de stéatopathie non alcoolique ou *Non Alcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD). Quelle que soit leur étiologie, les maladies chroniques du foie ont en commun le processus de fibrogenèse. La fibrogenèse consiste en des modifications quantitatives et qualitatives de la matrice extra-cellulaire avec l'accumulation de fibrose, constituée principalement par des dépôts de collagène. La fibrose progresse plus ou moins rapidement selon le contexte pathologique pour aboutir à la désorganisation globale de l'architecture du foie, caractéristique de la cirrhose. C'est au stade de cirrhose qu'apparaissent les complications qui rendent la maladie du foie symptomatique : hypertension portale, insuffisance hépato-cellulaire et risque de carcinome hépato-cellulaire.

Les myofibroblastes sont les cellules qui synthétisent la matrice extra-cellulaire et qui représentent donc les acteurs principaux de la fibrogenèse. Dans le foie pathologique, il existe plusieurs types de myofibroblastes. Les myofibroblastes dérivant des cellules étoilées du foie ont été le premier type de myofibroblaste hépatique à être identifié. Leur rôle dans la fibrose et également dans l'angiogenèse a été largement documenté. Plus récemment, une deuxième population de myofibroblastes a été mise en avant sur la scène de la fibrose hépatique : les myofibroblastes portaux. Néanmoins, les propriétés de ces cellules sont peu connues et leur rôle dans l'angiogenèse hépatique n'a jamais été exploré.

L'angiogenèse est le processus faisant apparaître de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants. Plusieurs études ont montré que l'angiogenèse accompagnait la fibrogenèse dans les maladies chroniques du foie. L'angiogenèse hépatique serait une

conséquence de la fibrose, mais aurait aussi elle-même des conséquences sur la fibrose. En effet, la plupart des études menées dans différents modèles animaux de fibrose hépatique ont montré que l'inhibition de l'angiogenèse diminuait la fibrose. Néanmoins, certaines études ont rapporté des résultats contradictoires, montrant ainsi la complexité des relations entre angiogenèse et fibrogenèse.

Les microparticules sont des vésicules extra-cellulaires mesurant de 0,1 à 1 μ m de diamètre, pouvant être sécrétées par toutes les cellules à la fois en situation physiologique et pathologique. Les microparticules sont des médiateurs de la communication inter-cellulaire. Plusieurs données ont démontré qu'elles étaient impliquées dans le processus d'angiogenèse.

L'objectif de ce travail de thèse a donc été de :

- déterminer si les myofibroblastes portaux sont impliqués dans l'angiogenèse qui accompagne la fibrose hépatique
- préciser les mécanismes de leurs potentielles propriétés pro-angiogéniques, notamment en étudiant le rôle des microparticules.

Dans une première partie d'introduction, nous rapporterons les données de la littérature scientifique concernant les myofibroblastes portaux, l'angiogenèse hépatique et les microparticules. Dans une deuxième partie, nous détaillerons les résultats de nos travaux. Enfin, dans une troisième partie, nous dresserons les conclusions de notre travail et exposerons les perspectives qui en découlent.

Première partie

Introduction

Bibliographique

I. Les myofibroblastes portaux

Préambule : rappels sur l'anatomie fonctionnelle du foie

- La vascularisation du foie

Le foie reçoit 2 systèmes vasculaires afférents : la veine porte qui draine le sang veineux de tout l'abdomen et l'artère hépatique, branche du tronc coeliaque, efférent de l'aorte abdominale. La veine porte et l'artère hépatique pénètrent dans le foie par le hile hépatique et se ramifient pour donner des branches situées dans les espaces portes. Les espaces portes contiennent donc les vaisseaux afférents du foie. Le sang provenant de ces vaisseaux circule ensuite dans les vaisseaux capillaires sinusoides qui bordent les travées d'hépatocytes et qui convergent vers la veine centro-lobulaire. Les veines centro-lobulaires se drainent ensuite dans les veines sus-hépatiques, voies efférentes du foie.

- Les différentes populations cellulaires du foie

Le foie est composé de plusieurs types cellulaires. Les hépatocytes, aussi appelés cellules parenchymateuses du foie car assurant ses principales fonctions, sont les cellules épithéliales constituant la majorité du tissu hépatique (80% des cellules). Les cellules non parenchymateuses regroupent tous les autres types cellulaires : les cholangiocytes, cellules épithéliales bordant les canaux biliaires, les cellules endothéliales, bordant les vaisseaux sinusoides mais aussi les branches de l'artère hépatique et les branches de la veine porte, les macrophages du foie, appelées cellules de Kupffer, les cellules étoilées du foie et les autres cellules mésenchymateuses notamment les cellules musculaires lisses autour des vaisseaux, les fibroblastes de la capsule de Glisson (tissu conjonctif qui entoure le foie).

- L'unité fonctionnelle du foie : le lobule hépatique

Le lobule hépatique regroupe toutes les travées hépatocytaires dont les sinusoides se drainent dans la même veine centro-lobulaire (figure 1). Il peut être représenté comme un livre ouvert dont les pages seraient formées par les travées d'hépatocytes orientées de façon radiaire et dont le dos correspondrait à la veine centro-lobulaire, formant l'axe central du lobule. A la périphérie des lobules se trouvent les espaces portes, structures de tissu conjonctif contenant 3 éléments : la branche provenant de l'artère hépatique, la branche provenant de la

veine porte et le canal biliaire. La bile est produite par les hépatocytes et circule dans le canalicule biliaire de façon centrifuge, de la veine centro-lobulaire vers les espaces porte où elle rejoint le canal biliaire. Le canal de Hering correspond à la jonction entre le canalicule biliaire et le canal biliaire. C'est dans cette région que se trouvent les cellules ovals qui sont impliquées dans la régénération du parenchyme hépatique¹. Le sang, provenant de l'artère hépatique et de la veine porte circule entre les travées hépatocytaires dans les vaisseaux capillaires sinusoides, de façon centripète, depuis l'espace porte vers la veine centro-lobulaire. Les vaisseaux sinusoides présentent les particularités phénotypiques suivantes : ils sont discontinus, sont dépourvus de lame basale et leurs cellules endothéliales sont fenêtrées, c'est à dire qu'elles comportent des pores de 0,2 μm formant des tamis à leur surface. L'ensemble de ces caractéristiques favorise le passage des molécules du sang vers les hépatocytes. L'espace situé entre les cellules endothéliales sinusoidales et les hépatocytes est appelé l'espace de Disse.

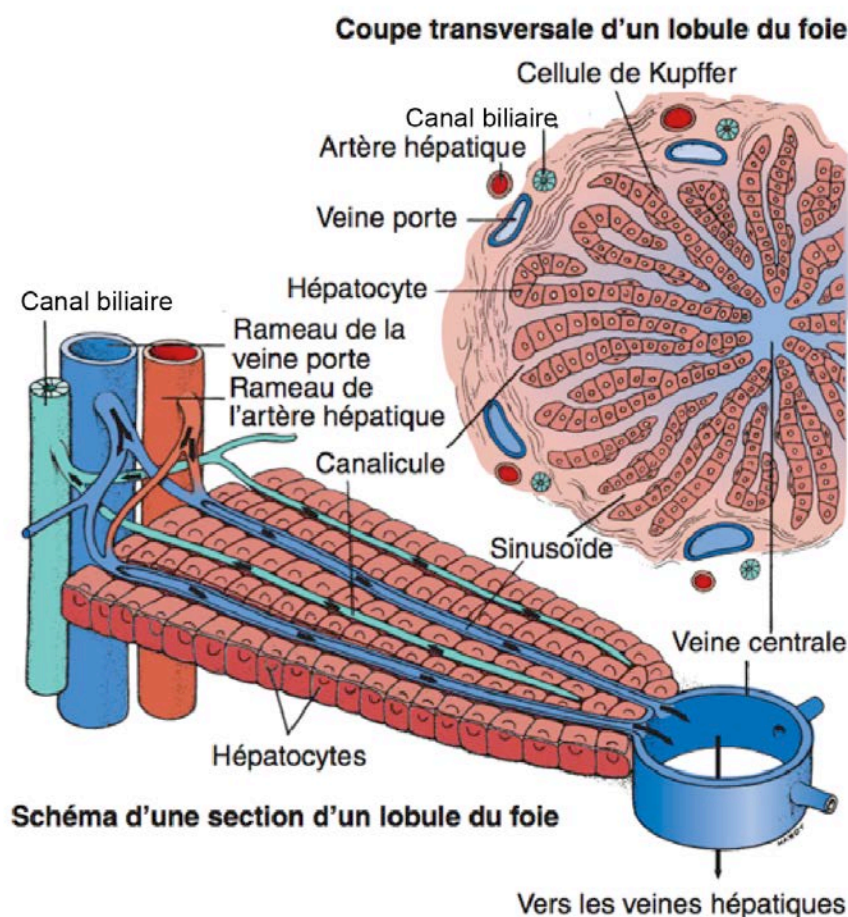


Figure 1 : Schéma du lobule hépatique. (d'après « Affections Hépatiques », Erpi Editions)

1) Définitions et caractéristiques générales des myofibroblastes

Les myofibroblastes sont des cellules mésenchymateuses caractérisées par l'association de propriétés des fibroblastes (capacité de production de matrice extra-cellulaire) et de propriétés de cellules musculaires lisses (contractibilité). Ils peuvent être définis comme des cellules qui développent une force contractile et des fibres de stress *de novo* et *in vivo*². Ils sont caractérisés par l'expression *de novo* de plusieurs protéines des cellules musculaires lisses et notamment de l'alpha smooth muscle actin (α -sma). Dans la majorité des travaux, les auteurs s'appuient justement sur l'expression d' α -sma comme marqueur pour étudier les myofibroblastes, en particulier grâce à l'immuno-histochimie (figure 2). Néanmoins, comme tous les myofibroblastes expriment α -sma, cette méthode ne permet pas de différencier les différents sous-types de myofibroblastes.

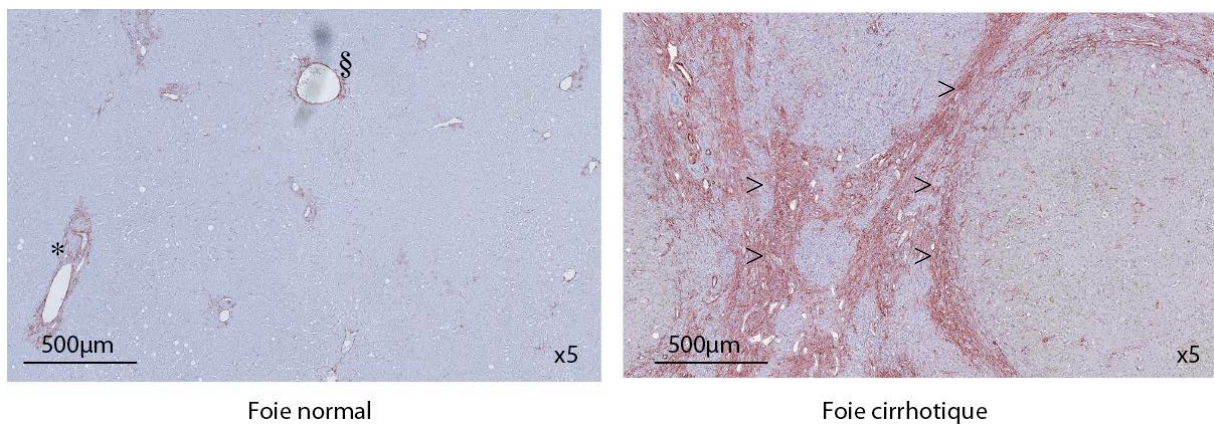


Figure 2 : Marquage α -sma du foie humain.

Photographies de coupes de foie humain normal (à gauche) et cirrhotique (à droite). Le foie normal ne contient pas de myofibroblaste et le marquage α -sma correspond aux cellules musculaires lisses disposées autour des vaisseaux des espaces portes(*) et autour des veines centro-lobulaires (§). Le foie cirrhotique contient de nombreux myofibroblastes qui sont localisés dans les septa fibreux (>).

Dans tous les tissus de l'organisme, les myofibroblastes sont impliqués dans le phénomène de fibrogenèse, défini par la production de fibrose. En condition physiologique, la fibrogenèse s'intègre dans le processus de réparation tissulaire. En effet, en cas de lésion tissulaire, par exemple une lésion cutanée, les cellules mortes sont phagocytées par des leucocytes (macrophages et polynucléaires neutrophiles) et la perte de substance (le vide) va être remplacée par de la fibrose. La fibrose est un tissu amorphe, c'est à dire dépourvu de cellule et constitué donc de matrice extra-cellulaire, principalement du collagène. Ce sont

donc les myofibroblastes qui, une fois activés, vont synthétiser le collagène responsable de la fibrose. L'activation des myofibroblastes est orchestrée par l'action de différentes cytokines synthétisées par les cellules inflammatoires et les cellules parenchymateuses, notamment le *Transforming growth factor-β* (TGF-β), principal facteur pro-fibrosant³. Par la suite, si les stimuli pro-fibrogéniques disparaissent, les myofibroblastes peuvent mourir par apoptose ou bien revenir à un état quiescent dit désactivé³. Si le tissu lésé a la capacité de régénération, de nouvelles cellules vont apparaître pour remplacer les cellules mortes et vont se mettre à leur place une fois que la fibrose aura été détruite lors de ce que l'on nomme la fibrolyse. La fibrolyse est donc le processus qui s'oppose à la fibrogenèse et qui consiste à dégrader la fibrose. Elle s'effectue par l'action d'enzymes spécialisées appelées metallo-protéinases de la matrice (MMP), dont les collagénases, qui vont dégrader les protéines de la matrice extra-cellulaire. Ce sont les myofibroblastes eux-mêmes qui vont sécréter les MMP. Ainsi, les myofibroblastes sont les acteurs principaux de la fibrogenèse et de la fibrolyse. En situation physiologique, il existe un équilibre entre la fibrogenèse et la fibrolyse, afin que le tissu reste identique à lui-même. En cas de pathologie chronique, par exemple une hépatite virale chronique, l'inflammation persistant, cet équilibre est rompu car la fibrogenèse est trop importante et dépasse les capacités de la fibrolyse. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la fibrose hépatique ont été détaillés dans une revue rédigée pendant ce travail de thèse⁴.

2) Les différentes populations de myofibroblastes hépatiques

Dans le foie sain, il n'y a pas de myofibroblaste hépatique et dans ce cas le marquage α -sma correspond uniquement aux cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux dans les espaces portes et les veines centro-lobulaires (figure 2).

Les myofibroblastes vont apparaître et s'accumuler dans le foie en cas de pathologie chronique et leur nombre va croître de façon proportionnelle à la fibrose, comme en atteste l'évolution croissante de l'expression du marqueur α -sma au cours de la fibrose hépatique. Dans le foie, comme dans les autres tissus, l'origine des myofibroblastes est sujet à débat. L'origine et la fonction des différents myofibroblastes hépatiques a fait l'objet d'une revue publiée pendant ce travail de thèse³. Les myofibroblastes hépatiques vont naître principalement de la trans-différenciation de cellules mésenchymateuses résidentes du foie. Ainsi, il existe 2 types principaux de myofibroblastes hépatiques : les myofibroblastes

dérivant des cellules étoilées du foie et les myofibroblastes portaux⁵. Ces derniers sont, comme leur nom l'indique, localisés dans l'espace porte et dériveraient des cellules mésenchymateuses portales localisées à proximité des canaux biliaires. Il existe probablement d'autres types de myofibroblastes hépatiques : ceux provenant des cellules mésenchymateuses de la capsule de Glisson et ceux provenant des cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux. Les myofibroblastes hépatiques pourraient également provenir de cellules extérieures au foie, les fibrocytes de la moelle osseuse⁶, comme cela a été montré dans certains modèles animaux de fibrose rénale⁷. Cependant, une étude récente a montré que les cellules provenant de la moelle osseuse avaient un rôle limité dans la fibrose hépatique⁸. Enfin, la théorie de la transition épithélio-mésenchymateuse suppose que les cellules épithéliales du tissu (dans le foie : les hépatocytes principalement, mais aussi les cellules des canaux biliaires, les cholangiocytes) pourraient se transformer en cellules mésenchymateuses pour donner des myofibroblastes. Même s'il existe plusieurs arguments s'appuyant sur des données obtenues *in vitro* en faveur de cette théorie⁹, des études de lignage cellulaire ont montré que la transition épithélio-mésenchymateuse ne se produisait pas *in vivo* dans le cadre de la fibrose hépatique¹⁰⁻¹². Ces données n'excluent pas définitivement la transition épithélio-mésenchymateuse du tissu hépatique, elle pourrait en effet avoir lieu dans d'autres contextes, notamment lors de la carcinogenèse¹³.

L'identification et la caractérisation des différents types de myofibroblastes hépatiques permettrait de mieux comprendre les mécanismes cellulaires de la fibrogenèse, et aussi de la fibrolyse, et pourrait permettre d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques pour la fibrose hépatique. En effet, malgré leur lourd impact en terme de santé publique, les maladies chroniques du foie ne disposent aujourd'hui que de trop peu de ressources thérapeutiques. Actuellement, le seul traitement de la cirrhose décompensée est la transplantation hépatique. Ce traitement est non seulement grevé d'une lourde morbidité mais est également d'une accessibilité limitée en raison de la pénurie de greffons hépatiques. Il est donc primordial de pouvoir traiter les maladies chroniques du foie avant le stade de la cirrhose en agissant sur la progression de la fibrose. Les seuls traitements efficaces sur la fibrose du foie disponibles aujourd'hui sont les traitements de la cause de l'hépatopathie. En effet, les traitements anti-viraux contre les virus des hépatites B et C ont démontré une régression histologique de la fibrose hépatique^{14, 15}. Néanmoins, pour d'autres hépatopathies comme la cirrhose biliaire primitive (CBP) ou la cholangite sclérosante primitive (CSP), l'étiologie n'est pas connue et il n'existe donc pas de traitement spécifique pour ces maladies.

Il est donc urgent de développer de nouveaux outils thérapeutiques efficaces contre la fibrose du foie.

3) Les cellules étoilées du foie

Les cellules étoilées du foie (CEF) ont été décrites il y a 40 ans^{16,17}. Elles ont connu plusieurs dénominations au cours des années: cellules de Ito, lipocytes, *fat storing cells*, *perisinuodal cells* et CEF. Ces cellules mésenchymateuses sont situées entre les cellules endothéliales sinusoidales et les hépatocytes dans l'espace de Disse (figure 3).

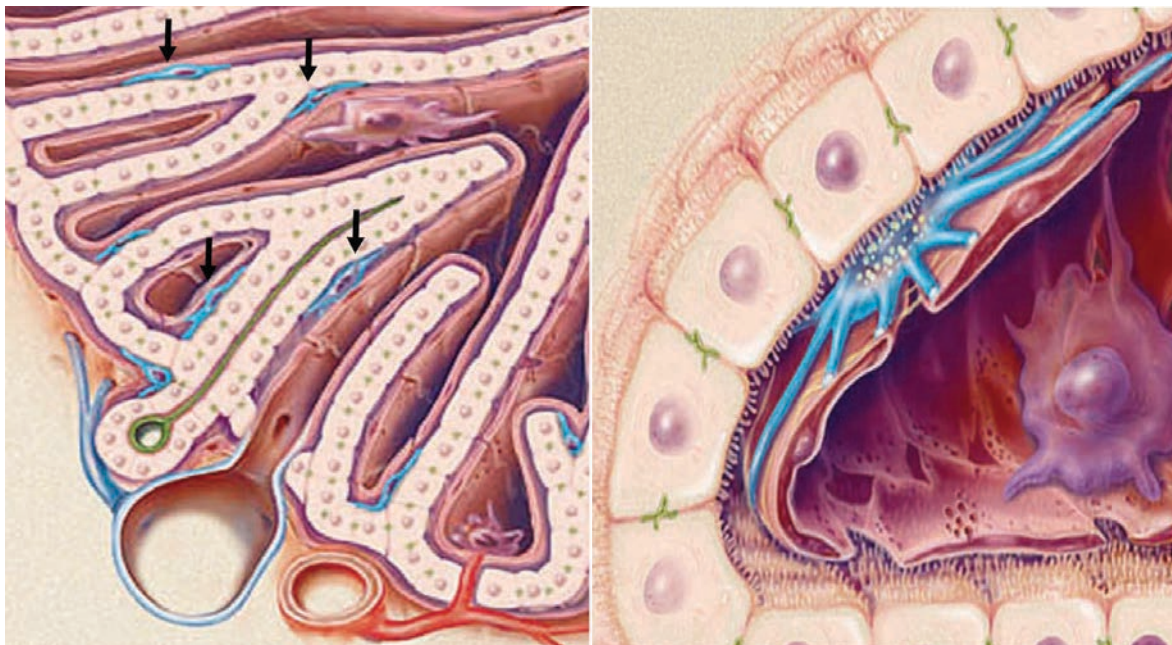


Figure 3 : Schéma localisant la cellule étoilée du foie¹⁸

La cellule étoilée du foie, représentée en bleu, est située dans l'espace de Disse entre les hépatocytes, en beige, et les cellules endothéliales sinusoidales, en rouge.

Les CEF exercent de multiples fonctions dans le foie sain¹⁸. Premièrement, elles assurent le stockage de la vitamine A, vitamine liposoluble, qui est contenue dans les gouttelettes lipidiques de leur cytoplasme, expliquant leur appellation de lipocyte. Ces gouttelettes lipidiques leur confèrent la particularité d'être fluorescentes sous l'excitation par les UV d'une longueur d'onde de 328 nm. De plus, de par ces gouttelettes lipidiques, les CEF ont une densité particulière qui permet de les isoler spécifiquement des autres cellules non parenchymateuses du foie afin de pouvoir les étudier en culture. Deuxièmement, en raison de leur localisation autour des cellules endothéliales sinusoidales, les CEF exercent également le

rôle de péricyte. Les péricytes sont les cellules murales des capillaires, tout comme les cellules musculaires lisses sont les cellules murales des artérioles, artères, veinules et veines. Les péricytes exercent un rôle clef dans l'homéostasie des vaisseaux, la régulation du tonus vasculaire et l'angiogenèse¹⁹. Les CEF et les cellules endothéliales sont en proximité étroite et leurs interactions sont indispensables pour leur développement et leurs fonctions. L'utilisation d'un modèle transgénique de *zebrafish* a révélé que les cellules endothéliales sinusoïdales étaient requises pour la localisation correcte des CEF lors de l'embryogenèse²⁰. Après le développement embryonnaire, les cellules endothéliales sinusoïdales vont continuer à agir sur les CEF, notamment en inhibant leur activation myofibroblastique et en favorisant leur retour à l'état quiescent^{21, 22}. A l'inverse, les CEF vont agir sur les cellules endothéliales en maintenant leur différenciation sinusoïdale²³.

Les CEF jouent un rôle clef dans la fibrogenèse hépatique. Elles furent les premières cellules identifiées comme étant capables de produire le collagène en excès dans le foie pathologique chez le rat¹⁶. Depuis lors, la thèse des CEF comme seul précurseur des myofibroblastes dans le foie a largement dominé le champ de la recherche sur la fibrose hépatique¹⁸, à tel point que pour certains auteurs, les cellules α -sma positives dans le foie sont les CEF²⁴. Grâce à une méthode d'isolement spécifique établie et standardisée, les CEF ont pu être largement étudiées *in vitro*. Lorsqu'elles sont cultivées sur un support plastique, les CEF se transforment progressivement pour acquérir un phénotype myofibroblastique : elles s'étalent et émettent des prolongements cytoplasmiques, leurs gouttelettes lipidiques se raréfient et ainsi leur fluorescence diminue (figure 4). Cette activation myofibroblastique qui se produit *in vitro* mime celle qui a lieu *in vivo* en cas de pathologie chronique du foie. Ainsi, après un passage en culture, on dispose de CEF myofibroblastiques (CEF-MF), constituant un modèle d'étude des myofibroblastes dérivant des CEF présents dans le foie pathologique *in vivo*.

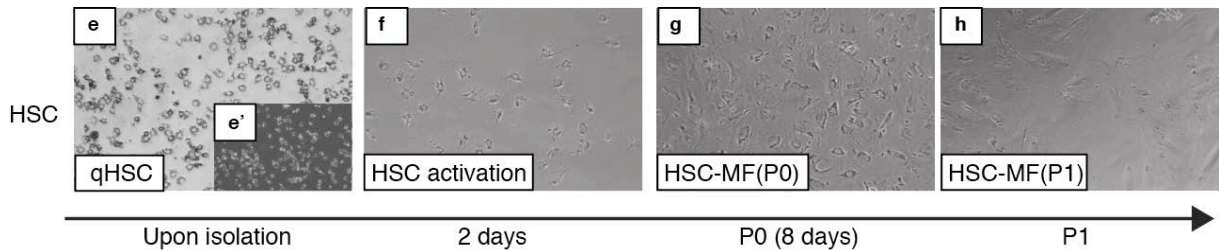


Figure 4: Activation myofibroblastique des CEF in vitro.²⁵

Les CEF (HSC) ont été isolées à partir de foie de rat sain et placées en culture sur support plastique. Photographies des cellules observées au microscope à contraste de phase (e-h) et au microscope à fluorescence (e') sous excitation par UV de 328 nm de longueur d'onde, aux temps indiqués. Immédiatement après leur isolement, les CEF contiennent des gouttelettes lipidiques denses caractérisées par leur auto-fluorescence, leur état est qualifié de quiescent (qHSC) (e'). Lors de la culture, les CEF s'étalent, leur contenu en gouttelettes diminue (f-g) et après un passage (P1), elles présentent un aspect de myofibroblaste (HSC-MF) (h).

Cette transformation phénotypique s'accompagne de l'acquisition des fonctions myofibroblastiques : capacités de produire en excès la matrice extra-cellulaire, de se contracter et de migrer sous l'effet de chémo-attractants^{17, 26-28}. Les facteurs qui déclenchent l'activation myofibroblastique des CEF ont été décrits en détails¹⁸. Ils comprennent des stimuli biologiques comme le lipopolysaccharide²⁹, physico-chimiques comme l'hypoxie³⁰ et mécaniques comme la dureté du support de culture³¹. L'étude des CEF *in vitro* a permis de proposer d'autres marqueurs qu' α -sma pour ces cellules comme la Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)³² et la desmine³³⁻³⁵.

In vivo, l'implication des CEF dans la fibrose hépatique a été également démontrée⁵. Une équipe a récemment généré une souris transgénique dans laquelle les CEF étaient marquées par une protéine vert-fluorescent exprimée sous l'effet du même promoteur que celui de la lécithine rétinol acyltransférase (Lrat), protéine impliquée dans la formation de la vitamine A et spécifiquement exprimée par les CEF³⁶. Dans le foie de ces souris soumises à différents modèles expérimentaux de fibrose hépatique, la majorité des cellules α -sma positives (82 à 96%) étaient vert-fluorescent démontrant ainsi que la majorité des myofibroblastes hépatiques dérivent des CEF³⁶. Néanmoins, cette étude repose sur le fait que la protéine Lrat serait exclusivement exprimée par les CEF. Si tout autre type cellulaire exprime Lrat, même temporairement, il sera également marqué en vert fluorescent et pris à tort pour une CEF. C'est là toute la difficulté de disposer de marqueurs spécifiques et infaillibles permettant de distinguer sans erreur les différents types de myofibroblastes.

En plus de leur implication dans la fibrogenèse, les CEF possèdent également un rôle dans l'angiogenèse hépatique. En effet, en tant que péricyte, les CEF établissent des interactions physiques directes avec les cellules endothéliales sinusoidales et régulent le

développement vasculaire, la stabilisation, la maturation et le remodelage vasculaire. Les mécanismes de l'action angiogénique des CEF seront détaillées plus loin dans le paragraphe II, 3, b.

4) Les myofibroblastes portaux

a) Concept d'un nouveau myofibroblaste hépatique différent de la CEF

Récemment, la thèse des CEF comme unique précurseur des myofibroblastes hépatiques a été remise en question. Plusieurs études ont clairement montré que des cellules, ne contenant pas de gouttelettes lipidiques fluorescentes, donc différentes des CEF, peuvent également se transformer en myofibroblastes en culture^{32,35}. Des travaux menés *in situ* dans le foie de rat après ligature de la voie biliaire principale, ont également montré que des fibroblastes résident dans l'espace porte et s'accumulent avec la fibrose, autour des canaux biliaires³³, précisément dans les zones où l'on détecte le marquage α -sma³⁵. De leur localisation dans l'espace porte découle donc leur dénomination de « myofibroblastes portaux ». De plus, des études d'immuno-histochimie ont montré que, dans le foie fibreux chez l'homme ou chez le rat, les myofibroblastes situés dans les espaces portes ont un profil d'expression différent de celui des myofibroblastes localisés autour des sinusoides, suggérant ainsi qu'il existait bien 2 sous-populations distinctes de myofibroblastes dans le foie pathologique: les myofibroblastes dérivant des CEF et les myofibroblastes portaux (MFP)³⁷.

Plusieurs arguments plaident pour un rôle majeur des MFP dans la fibrogenèse. Dans toutes les maladies chroniques du foie, y compris celles où la lésion initiale est intra-lobulaire, comme la maladie alcoolique du foie ou la NAFLD, la fibrose débute dans les espaces portes, pour s'étendre ensuite vers le parenchyme en dessinant des travées fibreuses appelées septa³⁸⁻⁴². Ainsi, la célèbre classification de la fibrose selon le score METAVIR⁴³ cote la fibrose débutante ou modérée dite « F1 » lorsque celle-ci est restreinte aux espaces portes (tableau 1). Cette caractéristique de la fibrose hépatique contraste avec la localisation intra-lobulaire des CEF et suggère un rôle important pour les MFP dans la fibrogenèse.

La réaction ductulaire constitue un autre argument plaçant pour l'implication des MFP dans la fibrogenèse. Elle désigne la prolifération des canaux biliaires qui se fait à partir des espaces portes et qui accompagne la progression de la fibrose dans toutes les maladies chroniques du foie, qu'elles soient ou non d'origine biliaire. La réaction ductulaire pourrait

être un facteur déclenchant de la fibrogenèse en stimulant l'activation myofibroblastique^{34, 35}. Or, les cellules qui donnent naissance aux MFP sont localisées en étroite proximité des canaux biliaires réalisant cette réaction ductulaire.

Tableau 1 : Classification de la fibrose selon le score METAVIR.⁴³

Score	Description
F0	Absence de fibrose
F1	Fibrose portale et périportale sans septa
F2	Fibrose portale et périportale avec rares septa
F3	Fibrose portale et periportale avec nombreux septa
F4	Cirrhose : fibrose annulaire délimitant des nodules de régénération

b) Caractéristiques des MFP

Notre équipe a établi un modèle cellulaire de MFP, obtenus à partir de la culture des explants de canaux biliaires³⁵. Ces cellules ont plusieurs aspects communs avec les autres modèles de MFP obtenus par des méthodes d'isolement différentes^{32, 44}. Elles peuvent se distinguer des CEF-MF sur la base de critères morphologiques et de comportement en culture. Après leur isolement d'un foie normal de rat et leur mise en culture dans les même conditions, les CEF-MF présentent une forme arrondie avec un cytoplasme volumineux et une survie faible après plusieurs passages alors que les MFP ont tendance à avoir une forme plus allongée avec des fibres de stress plus nombreuses et surtout prolifèrent de façon importante, même après plusieurs passages⁴⁵. L'activation myofibroblastique des MFP requiert le TGF- β et la tension mécanique⁴⁴ et peut être déclenchée par le *Platelet-derived growth factor-BB* (PDGF-BB)⁴⁴ ou par les acides biliaires⁴⁶. Notre équipe a montré l'implication des MFP dans la fibrose hépatique *in vivo*. Dans 2 modèles de maladie hépatique cholestatique induits par ligature de la voie biliaire principale ou ligature de l'artère hépatique, la fibrose impliquait principalement des myofibroblastes qui étaient négatifs pour la desmine, donc présumés d'origine portale⁴⁷. Dans ces 2 modèles, les CEF présentaient des changements précoces de leur phénotype dominés par une prolifération accrue et une sur-expression de desmine^{34, 47} mais seulement une minorité de ces cellules se convertissaient en myofibroblastes produisant

de la matrice extra-cellulaire, lesquels, après une période prolongée, apparaissaient délimiter les nodules de régénération hépatique⁴⁷. Récemment, une autre équipe a confirmé l'implication des MFP dans la fibrose hépatique *in vivo*, en montrant que les MFP constituaient 70% des myofibroblastes isolés à partir du foie de souris après ligature de la voie biliaire principale⁵. Cependant, cette même étude a montré une contribution mineure des MFP à la population totale des myofibroblastes hépatiques dans un autre modèle de fibrose (intoxication par tétrachlorure de carbone chez la souris), suggérant ainsi que l'implication des MFP serait limitée à la fibrose de type biliaire⁵.

D'autres équipes ont étudié les MFP en utilisant des modèles cellulaires différents du notre^{32,44}. Le modèle de « myofibroblaste de foie de rat » (« *rat liver myofibroblastes* ») est constitué des myofibroblastes provenant de l'activation *in vitro* d'une fraction des cellules non mésenchymateuses du foie de rat sain³². Le modèle de « fibroblastes portaux » (« *portal fibroblast* ») correspond aux cellules mésenchymateuses individuelles obtenues à partir de la digestion enzymatique de l'arbre biliaire du foie de rat sain⁴⁴. Ces 2 modèles correspondent bien à des populations de myofibroblastes primaires de foie de rat mais elles sont moins homogènes et regroupent probablement des MFP avec d'autres types de myofibroblastes hépatiques (comme ceux issus de l'activation des cellules musculaires lisses).

c) Etude comparative des MFP et des CEF-MF

Notre équipe a cherché à déterminer les contributions relatives des MFP et des CEF-MF aux différents aspects de la réparation tissulaire hépatique en comparant ces 2 populations à des stades similaires de différenciation myofibroblastique en culture, au moyen d'une analyse protéomique 2-DE MS/MS⁴⁵. Cette analyse a montré que les protéines préférentiellement exprimées par les MFP par rapport aux CEF-MF étaient principalement liées aux fonctions spécifiques des cellules myofibroblastiques. La protéine pour laquelle la différence d'expression entre les 2 types cellulaires était la plus importante était la phosphocofiline. Il s'agit d'une petite protéine se liant à l'actine qui s'accumule pendant la différenciation myofibroblastique et favorise la formation des fibres de stress et la contraction. La plupart des protéines sur-exprimées dans les CEF-MF par rapport aux PMF étaient impliquées dans la réponse au stress, en particulier le stress lié à l'hypoxie, confirmant

ainsi les liens entre hypoxie, angiogénèse et fibrose dans le foie ⁴⁸. La protéine montrant le plus grand niveau de sur-expression relative dans les CEF-MF était la cytoglobine. Cette protéine, aussi appelée *stellate cell activation-associated protein* (STAP), est une globine induite par l'hypoxie et possède la capacité de transformer les dérivés réactifs de l'oxygène. Dans les CEF-MF, la cytoglobine est sur-exprimée durant l'activation myofibroblastique ^{45, 49} et protège contre le stress oxydatif et la fibrose ⁵⁰. Cette analyse protéomique a permis d'identifier de nouveaux marqueurs potentiels en plus de ceux déjà rapportés pour distinguer les MFP des CEF-MF : fibuline-2 et Thy-1 pour les MFP et réeline, cytoglobine, α 2-macroglobine, mannan-binding lectine serine peptidase 1 (MASP-1), GFAP et retinol-binding protein (RBP) pour les CEF-MF . Le tableau 2 résume l'ensemble des marqueurs des CEF et des MFP rapportés par la littérature.

Tableau 2 : Marqueurs des CEF-MF et des MFP rapportés par la littérature. ³

Previously published proposed markers of hepatic stellate cell-derived myofibroblasts (HSC-MFs) and portal myofibroblasts (PMFs).

	Name (references)
HSC-MFs	Reelin [91] Cytoglobin [43] α -2-macroglobulin [14] Desmin [14] Vascular cell adhesion molecule 1 [14] Mannan-binding lectin serine peptidase [14] Glial fibrillary acidic protein [14,17] Pirin (iron-binding nuclear protein) [43] Protein disulfide isomerase family A, member 4 [43] Neural cell adhesion molecule 1 [14,17] Retinol binding protein 1, cellular [92]
PMFs	Fibulin 2 [14] Thy-1 cell surface antigen[93] Fibronectin 1 [14] N CAM[17] Gremlin [93,94] Heat shock protein 1 [43] Latexin [43] Cofilin 1, non-muscle [43]

Ces données obtenues par l'analyse du protéome suggèrent donc que les 2 types de cellules myofibroblastiques, MFP et CEF-MF, chacune exposée à un microenvironnement particulier, réaction ductulaire pour la première et hypoxie pour la seconde, prolifèrent et remplissent des fonctions spécialisées dans la fibrose et l'inflammation pour les MFP et dans la vasorégulation et la régénération hépatocellulaire pour les CEF-MF. Ces différences de fonctions entre les MFP et les CEF ont été appuyées par des données récemment publiées montrant que les 2 types cellulaires ne répondaient pas de la même façon à la stimulation par des cytokines⁵.

Notre équipe a poursuivi la comparaison des 2 types de cellules myofibroblastiques en analysant leur transcriptome grâce à la technique de microarray pangénomique (Thèse de Nelly Bosselut, 2010). L'analyse a été effectuée sur les cellules en culture après un passage, alors qu'elles étaient pleinement différenciées en myofibroblastes et exprimaient α -sma de façon comparable. La procédure d'analyse a identifié 3751 gènes significativement plus exprimés dans les MFP par rapport aux CEF-MF (tableau 3).

Tableau 3 : Résultats du transcriptome. (Thèse de Nelly Bosselut, 2010)

Tableau disponible sur internet par le lien suivant :
http://corneliu.henegar.info/projects/FunNet/hepatology_2013

La plupart des marqueurs de MFP déjà connus ont été retrouvés par cette analyse, incluant la fibuline-2, la fibronectine-1³², la gremline-1^{51,52}, Thy-1 cell surface antigen⁵², embigine, erythrocyte protein band 4.1-like 3⁵¹ et cofiline⁴⁵. Un nouveau marqueur plus discriminant a aussi été identifié par l'analyse du transcriptome: le collagène XV (col15a1) qui était fortement sur-exprimé dans les MFP par rapport aux CEF-MF (tableau 4). Dans ce travail de thèse, nous allons nous servir de ce nouveau marqueur pour pouvoir étudier les MFP *in vivo*.

Tableau 4 : Marqueurs des MFP identifiés par le transcriptome. ²⁵

Name	Symbol	Ratio ^B	Qval (%) ^C
Collagen, type XV, alpha 1	<i>Col15a1</i>	16.7	0
fibulin 2	<i>Fbln2</i>	12.3	0.05
gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)	<i>Grem1</i>	3.7	0
Thy-1 cell surface antigen	<i>Thy1</i>	3.7	0.12
Embigin	<i>Emb</i>	3.1	0.08
fibronectin 1	<i>Fn1</i>	2.8	0.05
very low density lipoprotein receptor	<i>Vldlr</i>	2.2	0.08
Hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	<i>Hmmr</i>	2.2	0.12
Max dimerization protein 3	<i>Mxd3</i>	2.1	0.12
Huntingtin-interacting protein 1 related	<i>Hip1r</i>	1.8	0.05
heat shock protein 1	<i>Hspb1</i>	1.8	0.08
natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B (atrionatriuretic peptide receptor B)	<i>Npr2</i>	1.7	0.45
erythrocyte protein band 4.1-like 3	<i>Epb4113</i>	1.6	2.68
fos-like antigen 1	<i>Fosl1</i>	1.5	1.46
discoidin domain receptor tyrosine kinase 2	<i>Ddr2</i>	1.4	0.45
Latexin	<i>Lxn</i>	1.4	0.45
cofilin 1, non-muscle	<i>Cfl1</i>	1.2	1.46

Gènes surexprimés dans les MFP par rapport aux CEF-MF. Comparaison du Col15a1 aux autres marqueurs des MFP précédemment rapportés par la littérature.

^B : Facteur multiplicatif d'expression du gène dans les MFP par rapport aux CEF-MF.

^C : Significativité, exprimée en valeur q estimée par la procédure d'analyse de significativité du microarray (SAM).

II. L'angiogenèse associée à la fibrogenèse hépatique

1) L'angiogenèse physiologique

a) Définitions

L'angiogenèse est le processus faisant apparaître de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants. Ce processus est différent de celui de vasculogenèse qui se produit lors du développement embryonnaire et qui correspond à la formation de vaisseaux *de novo*. Durant la vasculogenèse, les cellules endothéliales proviennent de la différenciation des cellules endothéliales progénitrices ou *endothelial progenitor cell* (EPC) et s'assemblent pour faire naître le premier réseau vasculaire⁵³. L'artériogenèse désigne le développement du réseau d'artérioles collatérales à partir d'artères pré-existantes, comme observé pour les artères coronaires ou cérébrales⁵⁴. L'angiogenèse est tout d'abord un phénomène physiologique, qui se produit principalement pendant le développement de l'organisme mais aussi après, par exemple, lors du cycle menstruel où de nouveaux vaisseaux se mettent en place dans la muqueuse utérine croissante.

b) Mécanismes moléculaires et cellulaires de l'angiogenèse physiologique

Les mécanismes de l'angiogenèse ainsi que les molécules les régulant ont été décrits de façon détaillée dans plusieurs revues (figure 5, tableau 5)^{55,56}.

Chez l'adulte sain, les cellules endothéliales quiescentes ont une longue demi-vie et sont protégées des agressions par l'action autocrine de signaux de maintien tels que le *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), NOTCH, l'angiopoïétine-1 et les *Fibroblasts growth factors* (FGF). Comme les vaisseaux apportent l'oxygène, les cellules endothéliales sont équipées de senseurs d'oxygène et de facteurs inductibles par l'hypoxie, tels que la *Prolyl hydroxylase domain-2* (PHD-2) et *Hypoxia inducible factor-2 α* (HIF-2 α) respectivement, qui permettent aux vaisseaux de réajuster leur forme pour optimiser le flux sanguin. Les cellules endothéliales quiescentes forment une monocouche de cellules aplaties avec une surface lisse et sont reliées entre elles par des jonctions inter-cellulaires constituées

des molécules telles que la VE-cadhérine ou les claudines. Ces cellules endothéliales sont entourées par des péricytes, qui empêchent la prolifération endothéliale et secrètent des signaux de survie cellulaire comme le VEGF et l'angiopoiétine-1. Les cellules endothéliales et les péricytes au repos produisent une membrane basale commune. Lorsqu'un vaisseau capte un signal pro-angiogénique tel que VEGF, angiopoiétine-2, FGF ou une autre chémokine secrétée par une cellule en hypoxie ou une cellule inflammatoire, tout d'abord, les péricytes se détachent du vaisseau (en réponse à l'angiopoiétine-2) et se libèrent de la membrane basale par dégradation protéolytique de celle-ci, par l'action des MMP. Les cellules endothéliales perdent ensuite leurs jonctions inter-cellulaires et le vaisseau se dilate. VEGF augmente la perméabilité endothéliale, entraînant l'extravasation des protéines du plasma qui vont alors échafauder une matrice extra-cellulaire provisoire. *Via* l'action des intégrines, les cellules endothéliales migrent à la surface de cette matrice extra-cellulaire nouvellement créée. Les protéases libèrent des molécules pro-angiogéniques contenues dans la matrice extra-cellulaire comme le VEGF et les FGF et remodelent cette matrice extra-cellulaire en un milieu angio-compétent. Pour construire un nouveau vaisseau organisé et empêcher que les cellules endothéliales se déplacent toutes vers le signal pro-angiogénique, une cellule endothéliale, nommée cellule «tip» (littéralement cellule de l'extrémité) est sélectionnée pour diriger l'extrémité du vaisseau en formation, grâce à l'action de facteurs comme les récepteurs du VEGF, les neuropilines, et les ligands de NOTCH : DLL-4 et JAGGED-1. Les cellules endothéliales voisines de la cellule «tip» adoptent le rôle secondaire de cellule «stalk» (littéralement cellule de la tige), qui vont, elles, se diviser pour allonger la tige (sous l'effet de NOTCH, NOTCH-regulated ankyrin repeat protein (NRARP), WNT, placental growth factor (PlGF) et FGF) et former une lumière (*via* l'action de VE-cadherine, CD34, les sialomucines, VEGF et hedgehog). La cellule «tip» est équipée de filopodes pour détecter les signaux de direction tels que les éphrines et les sémaphorines, alors que les cellules «stalk» transmettent l'information spatiale de positionnement aux cellules voisines afin que la «tige» puisse s'allonger correctement. Des cellules «pont» de la lignée myéloïde aident à la fusion du vaisseau en formation avec une autre ramification vasculaire naissante, permettant ainsi l'initiation du flux sanguin. Pour qu'un vaisseau néoformé devienne fonctionnel, les étapes de maturation et de stabilisation sont ensuite nécessaires. Les cellules endothéliales reviennent à leur état quiescent avec une forme aplatie, et les signaux tels que le PDGF, l'angiopoiétine-1, le TGF- β , l'éphrine-2 et NOTCH entraînent la couverture des cellules endothéliales par des péricytes. Des inhibiteurs de protéases comme les *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMP) et *Plasminogen*

activator inhibitor-1 (PAI-1) entraînent la déposition d'une nouvelle membrane basale. Enfin, les jonctions inter-cellulaires sont ré-établies entre les cellules endothéliales pour assurer une distribution optimale du flux sanguin. Si les vaisseaux ne peuvent pas être perfusés, ils régressent.

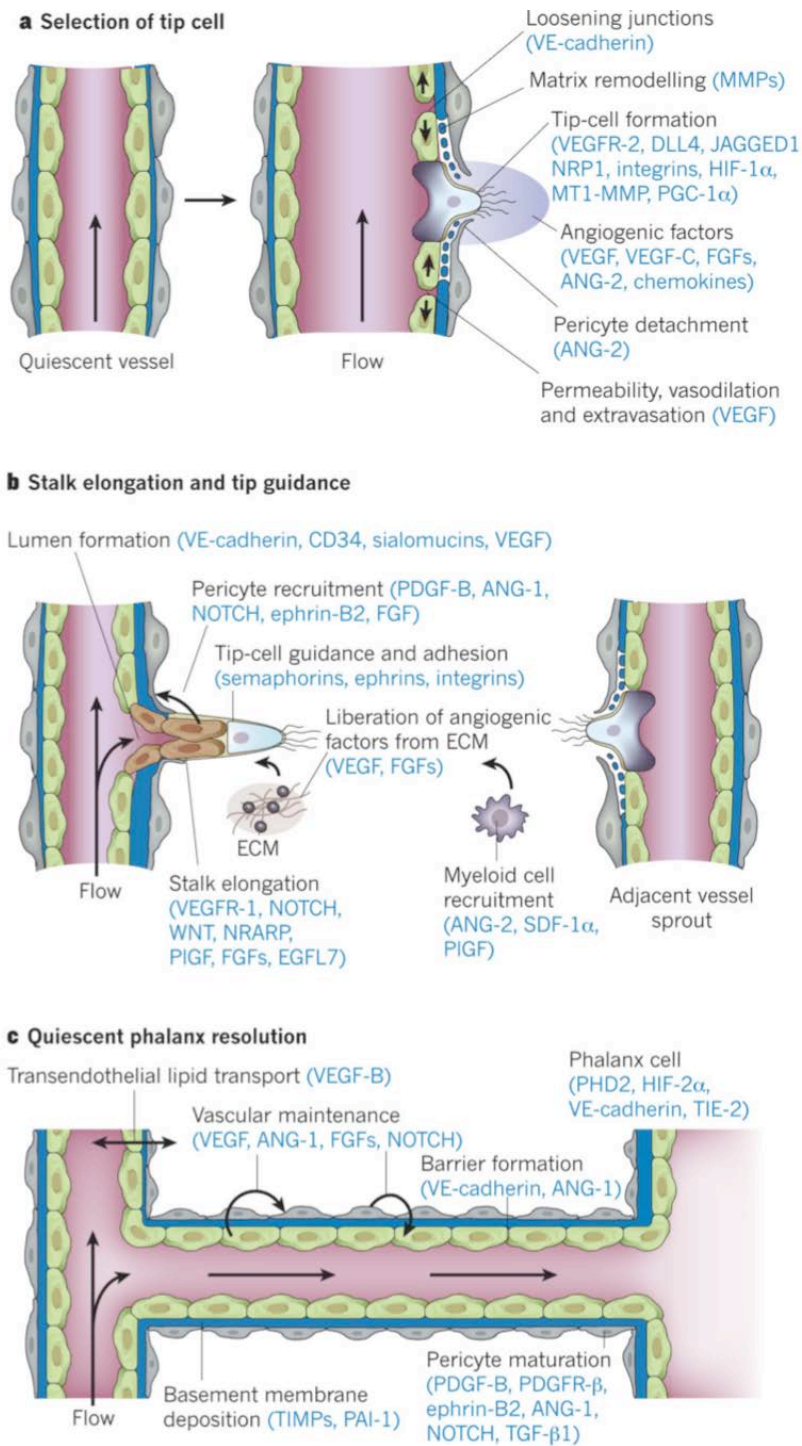


Figure 5 : Les étapes de l'angiogénèse.⁵⁵

Tableau 5 : Molécules régulant l'angiogenèse. ⁵⁶

Angiogenesis Activators	Actions
NO	Stimulates vasodilation
VEGF family members	Increase vascular permeability; induce EC proliferation; leukocyte adhesion; regulate neovessel lumen diameter
VEGF-R, NRP-1	Integrate angiogenic and survival signals
Integrins $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 6\beta 1$	ECM receptors, intercellular communication; mobilized during EC migration; regulate neovessel lumen diameter
uPA	Remodels ECM; releases and activates growth factors
PAI-1	Stabilizes nascent vessels
MMPs, heparinases, chymases, tryptases, cathepsins	Remodel ECM; release and activate growth factors
PIGF, aFGF, bFGF, HGF, TGF- α , TGF- β	Induce EC proliferation
MCP-1 and other chemokines	Pleiotropic role in angiogenesis
MEF2C	Regulates neovessel lumen diameter
Ephrins	Determine branching and arterial/venous specification
PDGF-B and receptors	Recruit pericytes
Ang-1	Stabilizes intercellular contacts; inhibits permeability
Tie-2	Receptor for Ang-1 and Ang-2
Ang-2	Ang-1 antagonist (destabilizes vessels; causes EC death)
TGF- $\beta 1$, endoglin	Promote vessel maturation, stimulate ECM generation, induce differentiation of mesenchymal cells to pericytes
Cyr61, Fisp12	Stimulate directed migration of EC through an $\alpha v\beta 3$ integrin-dependent pathway; ECM modifiers, promote EC survival
Angiogenesis Inhibitors	
VE-cadherin, PECAM-1, plakoglobin, β -catenin	Adherens junction molecules; intercellular adhesion; provide vessel tightness
Claudins, occludin, JAM-1, -2, -3	Tight junction molecules; intercellular adhesion, provide vessel tightness
Connexins	Gap junction molecules; facilitate intercellular communication
Integrins $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$	Suppress VEGF- and Flk-1-mediated EC survival
TIMPs	Inhibit ECM degradation by MMPs; inhibit EC proliferation
Angiostatin and related plasminogen fragments	Suppress tumor angiogenesis
Endostatin, antithrombin III, IFN- β , LIF, PF4	Suppress EC cell proliferation
TSP-1	Inhibits lumen formation
Ang-1 (excess)	Makes vessels too tight and inhibits sprouting
Ang-2	Facilitates sprouting in the presence of VEGF

c) La famille du VEGF

Le *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) est le principal facteur de croissance régulant le processus complexe de l'angiogenèse. Il s'agit en fait d'une famille regroupant plusieurs facteurs de croissance.

VEGF-A ou VEGF en est le composant principal. Il stimule l'angiogenèse physiologique et pathologique en agissant sur le récepteur VEGFR-2, également appelé FLK-1 ou encore Kinase insert Domain Receptor (KDR) qui est un récepteur à tyrosine kinase⁵⁷. Les neuropilines (NRP-1 et NRP-2) sont des co-récepteurs du VEGF qui augmentent l'activité de VEGFR-2 mais qui sont aussi capables d'induire un signal de façon indépendante de VEGF⁵⁸. L'absence de VEGF tout comme celle de VEGFR-2 empêche le développement vasculaire et donc la viabilité de l'organisme⁵⁹. En réponse à un gradient de VEGF, établi par ses isoformes solubles et liées à la matrice extra-cellulaire, la cellule « tip » sur-exprime DLL-4 ce qui active le récepteur NOTCH dans les cellules « stalk ». L'activation de NOTCH entraîne une diminution de l'expression de VEGFR-2 rendant les cellules « stalk » moins sensibles à VEGF, permettant ainsi à la cellule « tip » de garder son rôle de meneur⁶⁰. Les isoformes solubles de VEGF favorisent l'agrandissement du vaisseau, alors que les isoformes liées à la matrice extracellulaire stimulent la formation de ramifications. Le VEGF sécrété par les cellules tumorales, les cellules myéloïdes ou les cellules stromales et qui agit donc de façon paracrine sur les cellules endothéliales stimule la formation de ramifications vasculaires et rend les vaisseaux tumoraux anormaux⁶¹. Le VEGF sécrété par les cellules endothéliales elles-même et qui va donc agir de façon autocrine quant à lui maintient l'homéostasie vasculaire pour garder les vaisseaux « normaux »⁶². De nouvelles données montrent que l'effet biologique de la signalisation de VEGFR-2 dépend de sa localisation sub-cellulaire. Par exemple, pour que le VEGF induise la morphogenèse artérielle, VEGFR-2 doit transduire le signal du compartiment intra-cellulaire⁶³.

VEGF-B a une activité angiogénique limitée puisque sa délétion chez la souris n'entraîne pas d'anomalie de l'angiogenèse lors du développement et que le VEGF-B ne peut pas compenser l'inhibition du VEGF après la naissance⁶⁴. L'activité de VEGF-B serait restreinte à certains tissus tels que le cœur. Cependant, VEGF-B aurait également un effet positif sur la survie des neurones et pourrait exercer des effets métaboliques^{64,65}.

VEGF-C est le ligand des récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3 et active les cellules « tip » des vaisseaux sanguins⁶⁶. VEGFR-3 est nécessaire pour la formation vasculaire durant l'embryogenèse précoce mais devient ensuite un régulateur clef de la lymphangiogenèse, la formation des nouveaux vaisseaux lymphatiques à partir des lymphatiques pré-existants⁶⁷.

Le rôle précis du récepteur VEGFR-1 (également appelé FLT-1) dans l'angiogenèse reste à définir^{64, 68}. VEGFR-1 existe sous 2 formes : une forme ancrée dans la membrane plasmique et capable d'induire une signalisation intra-cellulaire et une forme soluble (aussi appelée s-FLT-1). En trappant ses ligands, sFLT-1 favorise la bonne direction d'une nouvelle ramification vasculaire ou inhibe le bourgeonnement. Du fait de sa faible activité tyrosine kinase, VEGFR-1 peut également servir de leurre pour le ligand VEGF, diminuant ainsi la quantité de VEGF disponible pour activer VEGFR-2 et expliquant ainsi pourquoi l'absence de VEGFR-1 résulte en une croissance vasculaire excessive⁶⁴.

Placenta Growth Factor (PlGF) est également un membre de la famille VEGF. C'est un ligand spécifique de VEGFR-1. Il existe 4 isoformes de PlGF: PlGF-1, PlGF-2, PlGF-3 et PlGF-4. Contrairement à VEGF, PlGF n'est pas indispensable pour le développement et est important seulement en contexte pathologique⁶⁹.

d) La famille de l'angiopoiétine

Les vaisseaux sains doivent être équipés de mécanismes capables de maintenir leur quiescence ainsi que d'autres capables de répondre à des stimuli d'activation angiogénique. La famille de l'angiopoiétine assure cette dualité de fonction. Chez l'homme, cette famille se compose de 3 ligands : angiopoiétine-1, angiopoiétine-2 et angiopoiétine-4 et de 2 récepteurs à activité tyrosine kinase : Tie-1 et Tie-2, aussi appelé Tek. L'angiopoiétine-1 est un agoniste de Tie-2 et l'angiopoiétine-2 fonctionne comme un ligand compétitif de l'angiopoiétine-1. L'angiopoiétine-4 n'a que très peu été étudiée mais agirait comme l'angiopoiétine-1, en tant qu'agoniste de Tie-2. L'angiopoiétine-3, exprimée seulement chez la souris, serait aussi un agoniste de Tie-2⁷⁰. Aucun ligand n'a été identifié pour Tie-1 et celui-ci pourrait agir sur la régulation de Tie-2⁷¹.

L'angiopoïétine-1 est exprimée par les cellules murales alors que l'angiopoïétine-2 est sécrétée par les cellules endothéliales « tip ». Dans un endothélium au repos, l'angiopoïétine-1 maintient l'état de quiescence en rapprochant les récepteurs Tie-2 des cellules endothéliales adjacentes, favorisant ainsi la cohésion des cellules. L'angiopoïétine-1 stimule aussi le recouvrement de l'endothélium par les cellules murales et le dépôt de la membrane basale, assurant ainsi le renforcement du vaisseau. En présence de facteurs pro-angiogéniques, les cellules endothéliales sécrètent l'angiopoïétine-2 qui va antagoniser l'action de l'angiopoïétine-1 sur Tie-2, entraînant ainsi le détachement des cellules murales. En présence de VEGF, l'angiopoïétine-2 est pro-angiogénique, stimulant la migration la prolifération et le bourgeonnement des cellules endothéliales. En l'absence de VEGF, l'angiopoïétine-2 entraîne la mort des cellules endothéliales et la régression du vaisseau. D'autre part, l'angiopoïétine-2 intervient dans la lymphangiogenèse.

Les protéines angiopoïétine-like (1 à 7) possèdent des similarités de structure avec les angiopoïétines mais ne se lient pas aux récepteurs Tie.

2) Les méthodes d'étude de l'angiogenèse

Pour évaluer le pouvoir angiogénique d'une molécule ou d'une cellule, on pourra étudier son effet dans différents tests d'angiogenèse. Ces tests d'angiogenèse peuvent être réalisés *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*⁷². De manière non exhaustive, sont présentés ci-dessous les tests les plus couramment utilisés, en prenant soin de détailler ceux qui seront utilisés pour nos travaux de thèse.

a) Tests in vitro

Ces tests évaluent séparément les différentes fonctions des cellules endothéliales qui sont mises à contribution lors des étapes de l'angiogenèse.

- Tests de prolifération des cellules endothéliales

Dans ces tests, un nombre défini de cellules endothéliales est ensemencé et après une certaine durée qui laisse le temps à la prolifération d'avoir lieu (en général 24 heures puisque la durée du cycle cellulaire des cellules endothéliales est de 18 à 24 heures), on mesure l'augmentation du nombre de cellules. Pour ce faire, plusieurs techniques sont à dispositions : la méthode MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), la mesure de l'incorporation dans l'ADN de la thymidine tritiée ou de la bromodeoxyuridine (BrdU) ou encore la mesure de l'expression de la protéine *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA).

- Tests de migration des cellules endothéliales

La migration peut être évaluée selon la technique modifiée de la chambre de Boyden. On utilise des inserts équipés de filtres qui vont séparer les puits des plaques de culture en 2 compartiments : inférieurs et supérieurs. Les cellules endothéliales sont déposées dans le compartiment supérieur du puits, sur le filtre muni des pores de 8 μm , permettant uniquement le passage actif des cellules vers un agent attractant placé dans le compartiment inférieur du puits. La surface du filtre peut éventuellement être recouverte par des protéines de la matrice extra-cellulaire (collagène, fibronectine) ou par un gel de matrice extra-cellulaire artificielle appelé Matrigel (voir plus loin). Après 6 heures d'incubation, on va recueillir le filtre et compter le nombre de cellules qui sont présentes sur sa face inférieure correspondant aux cellules qui ont migré. Ce test va donc apprécier la chémo-attraction (ou migration directionnelle) des cellules endothéliales en réponse à un gradient d'un agent soluble. Avec ce test, on peut également mesurer la chémo-cinétique (ou migration non dirigée), si l'on ajoute l'agent attractant dans les deux compartiments, supérieurs et inférieurs, de manière à générer un gradient nul.

La migration peut également être évaluée en appréciant le mouvement des cellules endothéliales pour recouvrir une zone vide de cellules, dans ce que l'on appelle le test de cicatrisation ou *wound healing assay*. Dans ce test, on va créer une plaie artificielle en raclant le tapis de cellules endothéliales en culture avec un objet contendant (*scratch test*). Des techniques plus modernes utilisent des inserts amovibles qui, une fois retirés de la surface de culture, laissent une zone vide de cellule endothéliale sans avoir à racler le tapis de cellules. Dans les 2 cas (*scratch test* ou avec l'insert amovible), la migration va être mesurée par la

vitesse de recouvrement de cette zone vide de cellule par les cellules endothéliales, appréciée par microscopie. Néanmoins, lors de ce test, d'autres fonctions que la migration des cellules sont mises en jeu, comme la capacité d'étalement et la prolifération, et peuvent en gêner l'interprétation.

Enfin, la migration peut également être mesurée en suivant l'empreinte laissée par les cellules endothéliales sur un support recouvert d'un substrat particulier comme des microbilles de polystyrène (*phagokinetic track*).

- Test de tubulogenèse sur Matrigel

La tubulogenèse est la capacité des cellules à pouvoir former des tubes c'est à dire des structures mimant des capillaires *in vitro*. Cette capacité de tubulogenèse apprécie la différenciation des cellules endothéliales. Aujourd'hui, les tests de tubulogenèse sont les tests les plus utilisés pour mesurer les propriétés pro-ou anti-angiogéniques d'une molécule. Ces tests requièrent d'ensemencer les cellules endothéliales sur du gel de matrice extra-cellulaire (Matrigel) qui stimule l'attachement, la migration et la différenciation des cellules endothéliales en structures tubulaires, mimant ce qui se produit *in vivo*. Le Matrigel est un mélange de protéines de la matrice extra-cellulaire et de la membrane basale et est dérivé du sarcome Engelbreth-Holm-Swarm de la souris ; il a été identifié comme un puissant stimulant de la tubulogenèse⁷³. Le Matrigel contient de la laminine, du collagène IV, des protéoglycanes héparane sulfate et de l'entactine/nidogène. Il contient également plusieurs facteurs de croissance comme TGF- β , *Endothelial growth factor* (EGF), *Insulin-like growth factor* (IGF), FGF, et *Tissue Plasminogen Activator* (TPA). Le développement récent d'un Matrigel réduit en facteurs de croissance (*Growth factor reduced Matrigel*) a permis d'éviter les problèmes de sur-stimulation des cellules endothéliales induite par le Matrigel classique. Les cellules endothéliales peuvent être ensemencées à la surface de Matrigel recouvrant des puits de culture, réalisant alors des tubes en 2 dimensions. Le développement des tubes se fait alors en 4 à 24 heures et peut être observé au microscope. La tubulogenèse sera quantifiée en mesurant différents paramètres ; les paramètres les plus couramment utilisés sont : la longueur des tubes, le nombre de tubes, la surface des tubes ou encore le nombre de points de branchements. Les tests de tubulogenèse peuvent également se faire en 3 dimensions, en utilisant des microbilles recouvertes par les cellules endothéliales qui seront ensuite plongées dans le Matrigel. Après 7 jours, la formation des tubules sera appréciée par des images

acquises sur toute la hauteur du Matrigel et sur lesquelles on mesurera la longueur et la largeur des vaisseaux.

L'ensemble de ces tests *in vitro* peut être réalisé en co-culture avec des cellules murales. En effet, lors de l'angiogenèse physiologique, après que les cellules endothéliales se soient assemblées pour former un tube, les cellules murales sont recrutées pour maintenir la quiescence et la stabilité du vaisseau. L'analyse des interactions entre cellules endothéliales et cellules murales est donc une partie intégrante de l'étude de l'angiogenèse¹⁹. Lors des expériences de co-culture, avant d'être ensemencés ensemble, les 2 types cellulaires devront être préalablement marqués afin d'être ensuite facilement distinguables. Ces expériences de co-culture permettent d'évaluer l'influence des cellules murales sur les cellules endothéliales et *vice versa*, et d'étudier les jonctions qui s'établissent entre les 2 types cellulaires, notamment les jonctions *gap* qui participent à la maturation vasculaire⁷⁴. De façon alternative, la co-culture peut se faire sans contact en utilisant les inserts qui séparent les puits des plaques de culture en 2 compartiments. Un type cellulaire est ensemencé dans le compartiment inférieur, sur la surface du puits, l'autre type cellulaire est ensemencé dans le compartiment supérieur, sur la surface de l'insert. Les inserts utilisés alors sont munis de filtres avec des pores de plus petite taille qui ne permettront pas le passage des cellules mais seulement des molécules qu'elles sécrètent.

b) Tests ex vivo

Ces tests utilisent la culture d'organes explantés, permettant ainsi la communication des cellules endothéliales avec leur environnement naturel. Ils consistent à cultiver *in vitro* des coupes d'organes dans des matrices en 3 dimensions et à observer le développement de micro-vaisseaux sur une période de 10 à 14 jours. La quantification se fait en mesurant le nombre et la longueur des micro-vaisseaux ou bien la surface recouverte par les micro-vaisseaux. Les explants les plus couramment utilisés sont les anneaux aortiques de rat, de souris, ou de poulet ou encore les artères carotides de porc. Un modèle récent propose la co-culture d'explants d'aorte et de veine cave pour regrouper les caractéristiques des vaisseaux artériels et veineux.

c) Tests in vivo

- La membrane chorioallantoïde de poulet

Il s'agit de la membrane qui entoure l'embryon de poulet dans son oeuf. Elle présente les avantages d'être facilement accessible, et de montrer une relative immunotolérance permettant de travailler avec des molécules ou des cellules provenant d'espèces différentes.

- Zebrafish

Le *Zebrafish* est un petit poisson tropical d'eau douce qui donne des centaines d'embryons par accouplement. Les embryons se développent en dehors de la mère, mesurent 1 mm et sont transparents, offrant donc une observation et une quantification aisées de la formation des vaisseaux sanguins par microscopie. Le plus souvent, un agent fluorescent est injecté dans les vaisseaux et ainsi l'ensemble de la vascularisation de l'embryon peut être observée au microscope confocal. Des modèles de *zebrafish* transgéniques exprimant une protéine fluorescente sous le contrôle de promoteur de gènes spécifiques des cellules endothéliales (VEGFR-2 ou Tie 2) permettent d'avoir des embryons dont les vaisseaux sont spontanément fluorescents.

- Implants chez la souris

Le matériel implanté peut être constitué d'une chambre aux parois poreuses, d'une éponge ou bien d'une matrice synthétique notamment du Matrigel. Le Matrigel est sous forme liquide à 4°C et se transforme en gel solide à 37°C. La substance à tester pour son pouvoir angiogénique peut donc être mélangée au gel liquide puis ensuite injectée en sous-cutané où se formera un implant solide dans lequel la substance pourra progressivement diffuser⁷⁵. Le Matrigel peut éventuellement être encapsulé dans une chambre en plexiglas ou dans un tube en plastique flexible avant son implantation. Plusieurs jours après son injection dans la souris, l'implant est récupéré pour être analysé. La réponse angiogénique sera évaluée soit en comptabilisant le nombre de vaisseaux présents sur des coupes de l'implant, soit en mesurant le contenu en hémoglobine dans l'implant entier.

- La cornée

La cornée est un tissu transparent avasculaire donc la formation de nouveaux vaisseaux y sera facilement visible et quantifiable. Dans de petites poches créées sur la cornée, il est possible de placer différents types de substances comme un fragment de tumeur, des cellules ou bien des cytokines contenues dans une pastille de laquelle elles vont progressivement être libérées. En même temps, on peut aussi administrer un traitement à l'animal par voie oculaire ou par voie systémique. On perfuse ensuite la cornée avec un marqueur fluorescent avant de la prélever pour en étudier la vascularisation.

- Les chambres d'angiogénèse

Dans cette technique, on réalise une chambre transparente permettant de visualiser la vascularisation *in vivo* grâce aux techniques de trans-illumination ou de microscopie intravitale. Une des méthodes la plus couramment utilisée est la chambre de pli cutané dorsal chez la souris. Deux cadres métalliques sont placés sur un pli de peau dorsale de l'animal, de manière à prendre en sandwich les deux couches de peau. Une des deux couches est excisée, exposant alors la face interne de l'autre qui sera recouverte par une lame incorporée dans l'un des cadres (figure 6). Il est possible d'ouvrir la lame pour déposer des cellules ou des traitements dans la chambre.

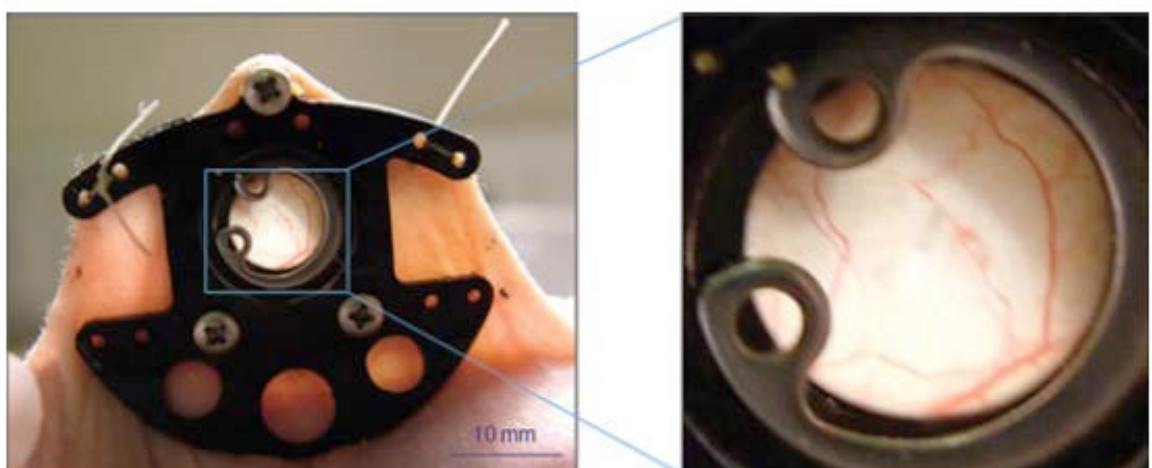


Figure 6 : Technique de la chambre de pli cutané dorsal chez la souris.⁷²

3) L'angiogenèse pathologique

a) Angiogenèse extra-hépatique

L'angiogenèse est donc un phénomène physiologique mais elle est également impliquée dans plusieurs contextes pathologiques. On distingue les pathologies où l'angiogenèse est insuffisante, comme dans les affections ischémiques, de celles où l'angiogenèse est excessive comme les affections de la rétine ou le cancer. Le cancer représente le contexte pathologique dans lequel l'angiogenèse a été le mieux étudiée et constitue aujourd'hui la principale indication clinique des traitements anti-angiogéniques⁵⁵. Ces traitements ont initialement ciblé le VEGF au moyen d'anticorps monoclonaux (comme le bevacizumab, indiqué dans le traitement du cancer colorectal) ou bien d'inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinase, qui vont bloquer l'action des VEGFR (comme le sorafenib, indiqué dans le traitement du carcinome hépato-cellulaire).

b) Angiogenèse intra-hépatique

L'angiogenèse intra-hépatique a d'abord été étudiée dans le contexte de la régénération hépatique. Le foie est l'unique organe possédant la capacité de régénération complète après résection chirurgicale majeure (jusqu'à 70% de son volume). Les différentes phases de l'angiogenèse physiologique et du remodelage sinusoidal ayant lieu pendant le processus de régénération hépatique ont été analysées de façon précise⁷⁶. Après hépatectomie partielle (résection des 2 tiers du volume du foie chez le rongeur), la croissance du foie restant permet la restauration du volume hépatique initial en 8 à 10 jours. Le pic de prolifération des cellules endothéliales sinusoidales survient après celui des hépatocytes⁷⁷. La prolifération initiale des hépatocytes aboutit à la formation de lobules hépatiques avasculaires où les cellules vont développer une hypoxie⁷⁸. Par l'intermédiaire de plusieurs molécules sécrétées par les hépatocytes (dont le VEGF), l'hypoxie va stimuler la prolifération et la migration des cellules endothéliales dans les lobules avasculaires, conduisant ainsi au rétablissement des vaisseaux sinusoides dans les lobules. A la fin du processus de régénération hépatique, l'architecture sinusoidale normale est ainsi restaurée. Dans ce contexte, il s'agit donc d'une angiogenèse temporaire et physiologique. En cas de pathologie chronique du foie, la fibrogenèse va s'accompagner d'une angiogenèse dite pathologique car persistante et

aboutissant à des vaisseaux « anormaux » c'est à dire avec un phénotype différent de celui retrouvé dans le foie sain. C'est cette forme d'angiogenèse associée à la fibrogenèse qui sera l'objet de ce chapitre.

- Les preuves de l'angiogenèse intra-hépatique

Le premier travail rapportant la manifestation d'une angiogenèse lors de la cirrhose a été publié il y a 30 ans ⁷⁹. Dans cet article, les auteurs mettent en évidence la présence de modifications vasculaires comme partie intégrante du remaniement de l'architecture hépatique qui a lieu au cours de la cirrhose. Depuis ce papier *princeps*, de nombreux auteurs ont montré que la fibrose hépatique était constamment accompagnée par la prolifération de nouveaux vaisseaux ⁷⁶. L'angiogenèse intra-hépatique a tout d'abord été démontrée dans les différents modèles animaux de fibrose hépatique. Dans le principal modèle de fibrose biliaire : la ligature de la voie biliaire principale ou *bile duct ligation* (BDL) chez le rat ⁸⁰, dans les modèles de fibrose secondaire à une nécrose hépatocytaire induite par des toxiques : administration de diethylnitrosamide chez le rat ³⁰ ou de tétrachlorure de carbone (CCl₄) chez le rat ⁸¹ ou chez la souris ⁸², ainsi que dans un modèle de NAFLD induite par régime déficient en choline chez le rat ⁸³, la densité vasculaire hépatique, mesurée par la quantification de l'immuno-marquage de coupes de foie par des marqueurs de cellule endothéliale (tels que le facteur Von Willebrandt (vWF) ou le CD31), augmente progressivement au cours de la fibrogenèse. Dans certaines études, l'angiogenèse était documentée par des preuves moins directes : par exemple, l'expression du gène CD31 (mesurée par PCR) était significativement augmentée dans le foie de la souris chez laquelle la cirrhose avait été induite par administration de CCl₄ ⁸⁴. D'autres auteurs ont même parfois conclu à la manifestation d'une angiogenèse seulement par l'observation d'une augmentation de l'expression de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, alors que cette observation, bien qu'en faveur d'une angiogenèse, ne la démontre pas réellement. Dans une étude récente, l'angiogenèse intra-hépatique qui survient chez la souris après BDL ou CCl₄ a pu être appréciée en visualisant la vascularisation du foie de manière non invasive par micro-scanner, technique d'imagerie moderne qui permet d'obtenir des images des vaisseaux en 3 dimensions chez l'animal vivant ⁸⁵.

Chez l'homme également, plusieurs études ont mis en évidence les résultats d'une angiogenèse hépatique dans le cadre des maladies chroniques du foie. Historiquement, l'hépatite virale C fut la première pathologie hépatique humaine dans laquelle on décrivit la

survenue d'une angiogenèse. En effet, l'étude par immuno-histochimie de coupes de foies de patients atteints d'hépatite chronique C a montré la formation de nouveaux micro-vaisseaux dans les espaces portes présentant des signes histologiques d'inflammation^{86,87}. Ensuite, des preuves de l'angiogenèse intra-hépatique ont successivement été rapportées dans le foie de patients atteints d'hépatite auto-immune⁵⁶ ou de cirrhose biliaire primitive⁸⁸. A nouveau de façon indirecte, comme chez l'animal, d'autres auteurs ont rapporté des arguments pour une angiogenèse dans les pathologies comme : l'hépatite chronique C, l'hépatite auto-immune, la cirrhose biliaire primitive et la cholangite sclérosante primitive. En effet, en analysant l'expression des gènes dans les foies humains cirrhotiques provenant de patients atteints de telles pathologies, ces auteurs ont pu mettre en évidence l'augmentation de l'expression de gènes clefs pour le processus d'angiogenèse tels que : des facteurs de croissance (VEGF, *Hepatic growth factor* (HGF), FGF-8, FGF *receptor*-1, PDGF) des molécules intervenant dans les jonctions cellule-cellule ou cellule-matrice (intégrines, beta-caténine), des molécules intervenant dans le remodelage de la matrice (des inducteurs des MMP) et des molécules impliquées dans la différenciation vasculaire et la polarité (éphrines)^{89,90}.

- Les causes de l'angiogenèse intra-hépatique : les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu

Premièrement, tout comme la fibrose, l'angiogenèse fait partie de la réponse à l'inflammation. Les cellules inflammatoires (cellules de Kupffer ou lymphocytes), stimulées en réponse aux lésions hépatocytaires (notamment lors des hépatites virales ou auto-immunes) ou cholangiocytaires (comme dans la cholangite sclérosante) vont sécréter des facteurs pro-angiogéniques favorisant la formation de nouveaux vaisseaux afin d'apporter par le flux sanguin de nouveaux facteurs de croissance nécessaires à la réparation tissulaire.

Deuxièmement, l'angiogenèse intra-hépatique se produit en réponse à l'hypoxie. Notre équipe a montré que l'hypoxie était un phénomène précoce lors de la fibrose hépatique³⁰. L'étude du foie du rat chez lequel la fibrose avait été induite par l'administration de diethylnitrosamide, a montré que les hépatocytes étaient en hypoxie. La proportion d'hépatocytes souffrant d'hypoxie augmentait au cours de la fibrose jusqu'à concerner la quasi-totalité du parenchyme au stade de cirrhose. Cette hypoxie intra-hépatique résulterait de la progression de la fibrose qui constitue une barrière physique faisant obstacle au flux sanguin et à l'apport d'oxygène dans le parenchyme hépatique et surtout d'anomalies

précoces de microcirculation associées à la fibrose. Ainsi, la fibrose hépatique induit l'hypoxie qui à son tour stimule l'angiogenèse. En effet, cette même étude a montré que les hépatocytes en hypoxie dans le foie fibreux exprimaient VEGF et que l'augmentation de l'expression hépatique de VEGF était corrélée à l'augmentation de la densité vasculaire intra-hépatique au cours de la fibrose³⁰. Lors de tests menés *in vitro*, les auteurs ont pu confirmer que l'hypoxie induisait l'expression de VEGF dans les hépatocytes mais également dans les CEF.

En effet, comme évoqué plus haut, les CEF participent à l'angiogenèse intra-hépatique. Premièrement, en tant que péricyte, les CEF établissent des interactions directes avec les cellules endothéliales. Notamment, il a été montré que les CEF développaient des adhésions focales (impliquant les protéines VASP) qui favorisent l'angiogenèse⁹¹. Les CEF établissent également des interactions paracrines avec les cellules endothéliales. Après que leur différenciation myofibroblastique ait été activée au cours de la fibrogenèse, les CEF-MF secrètent des cytokines pro-angiogéniques: le VEGF^{30, 80, 92-95} et l'angiopoiétine-1^{82, 96}. Les CEF produisent également le PDGF, un facteur pro-fibrogénique qui induit chez elles un phénotype pro-angiogénique²⁴. Dans une étude récente, des expériences menées *in vitro* ont montré que les CEF exercent plusieurs effets pro-angiogéniques sur les cellules endothéliales⁹⁶. Premièrement, elles stimulent la formation de jonctions inter-cellulaires entre les cellules endothéliales; de plus, elles augmentent les fonctions clés des cellules endothéliales pour l'angiogenèse: la migration et la tubulogenèse. Tous ces effets sont dépendants de l'action de l'angiopoiétine-1 qui est sécrétée par les CEF, sous l'effet paracrine et autocrine du PDGF. Le Sorafenib qui inhibe l'activité tyrosine kinase de récepteur de PDGF inhibe l'expression d'angiopoiétine-1 dans les CEF et inhibe ainsi leur action pro-angiogénique⁹⁶. La leptine, une hormone produite par le tissu adipeux, a également été montrée capable d'induire la production de d'angiopoiétine-1 ainsi que de VEGF par les CEF *in vitro*⁹³. Enfin, la communication entre CEF et cellule endothéliale peut également se faire *via* l'action de microparticules (voir plus loin dans le paragraphe III, 4).

Le remodelage vasculaire qui accompagne la fibrose hépatique ne se limite pas à l'angiogenèse, définie par une augmentation du nombre de vaisseaux du foie, mais comprend également des modifications qualitatives de l'arbre vasculaire hépatique, en particulier des vaisseaux sinusoides. En effet, le remodelage sinusoidal qui a lieu lors de la fibrose comprend les modifications suivantes: la vasoconstriction, l'augmentation du recouvrement des

vaisseaux par les péricytes et la capillarisation. La capillarisation des vaisseaux sinusoides correspond à la perte du phénotype caractéristique des cellules endothéliales sinusoidales avec l'apparition d'une membrane basale et la disparition des fenêtres. On parle alors de « différenciation » des cellules endothéliales sinusoidales. Il a été montré que les CEF jouaient un rôle important dans ce remodelage sinusoidal. Tout d'abord, par leur capacité de contraction et leur localisation de péricyte, les CEF-MF entraînent la vasoconstriction des sinusoides⁹⁷. De plus, les CEF, *via* l'action de l'angiopoïétine-1 sont capables de s'enrouler autour des cellules endothéliales sinusoidales, augmentant ainsi le recouvrement des vaisseaux sinusoides⁹⁶. Enfin, les CEF, une fois activées en myofibroblastes vont synthétiser de la matrice extra-cellulaire qui va participer à la formation d'une membrane basale autour des cellules endothéliales sinusoidales, contribuant ainsi au processus de capillarisation⁹⁸.

La participation des MFP à l'angiogenèse et plus largement au remodelage vasculaire associé à la fibrogenèse hépatique n'a jamais été étudiée.

Enfin, dans la cirrhose, l'angiogenèse ne se limite pas au foie. En effet, chez l'animal comme chez l'homme, il a été montré que la cirrhose était associée à une angiogenèse splanchnique qui aboutissait à la formation de vaisseaux collatéraux aggravant l'hypertension portale^{99, 100}. Le poumon des malades cirrhotiques peut également être le siège de l'angiogenèse contribuant alors au développement du syndrome hépato-pulmonaire, complication respiratoire grave de la cirrhose^{101, 102}. Cependant, l'angiogenèse extra-hépatique associée à la cirrhose ne sera pas étudiée lors notre travail de thèse.

- Les conséquences de l'angiogenèse intra-hépatique

L'angiogenèse survient donc en conséquence de la fibrose hépatique mais en retour a, elle-même, des conséquences sur la fibrose. En effet, la plupart des études menées sur des modèles animaux ont montré que l'inhibition de l'angiogenèse pouvait diminuer la fibrose hépatique (tableau 6), suggérant ainsi que l'angiogenèse permettrait d'entretenir ou bien d'aggraver la fibrose hépatique.

Tableau 6 : Synthèse des principaux travaux ayant inhibé l'angiogenèse dans le contexte de fibrose hépatique.

Référence	Modèle de fibrose	Anti-angiogénique	Résultat sur la fibrose (critère de jugement)
84	Souris CCl4	Anticorps anti VEGF-1 et anti-VEGFR-2	Diminution (α-sma, hydroxyproline)
81	Rat CCl4	Sunitinib	Diminution (α-sma, collagène)
82	Souris CCl4	Récepteur soluble D' Angiopoïétine-1	Diminution (rouge Sirius, α-sma, hydroxyproline)
99	Rat BDL	Sorafenib	Diminution (rouge Sirius, α-sma)
103	Rat BDL et TAA	Cilenglinide (inhibiteur intégrines)	Aggravation (collagène)
96	Rat BDL	Sorafenib	Diminution (rouge Sirius, élastoIRM)
104	Souris CCl4	Anticorps anti-PlGF	Diminution (rouge Sirius)
105	Rat BDL	Sorafenib	Diminution (α-sma, collagène)
106	Souris transgénique (inhibition du VEGF)		Aggravation (activation des CEF)
107	Souris CCl4	CxCl9	Diminution (rouge Sirius, hydroxyproline)
108	Rat CCL4	Anticorps anti-VEGF	Diminution (rouge Sirius, hydroxyproline)
109	Rat TAA	Celecoxib (inhibiteur COX-2)	Diminution (trichrome de Masson)
110	Rat NASH	Brivanib ou Sorafenib	Diminution (hydroxyproline)
111	Souris BDL Souris BDL après levée d'obstacle	Anticorps anti VEGF Anticorps anti VEGF	Diminution (rouge Sirius, hydroxyproline) Aggravation (rouge Sirius, hydroxyproline)

Sunitinib, sorafenib et brivanib sont des inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinases.

Cependant, parmi toutes les molécules utilisées pour inhiber l'angiogenèse, aucune n'agit de façon spécifique et exclusive sur la cellule endothéliale et l'angiogenèse. En effet, les inhibiteurs de tyrosine kinase, dont le chef de file est le sorafénib agissent sur le récepteur du VEGF mais aussi sur d'autres récepteurs tels que celui du PDGF, qui est aussi un facteur pro-fibrosant. De plus, le VEGF (ciblé par la majorité des stratégies anti-angiogéniques) a lui-même également une action pro-fibrosante. En effet, *in vitro*, le VEGF est capable d'augmenter les fonctions myofibroblastiques des CEF telles que la sécrétion de collagène I³⁰ ou la migration¹¹². On peut donc supposer que l'inhibition du VEGF conduira à un effet anti-fibrosant, indépendant de l'angiogenèse.

De plus, l'inhibition de l'angiogenèse est, la plupart du temps, associée à une réduction de la fibrose mais pas dans tous les cas. En particulier, une étude a montré que l'administration d'un traitement anti-angiogénique ne ciblant pas le VEGF entraînait une aggravation de la fibrose¹⁰³. Dans cette étude, le traitement par inhibiteur spécifique de l'intégrine alphavbeta3 chez le rat, chez lequel la fibrose hépatique avait été induite par BDL ou par administration de thioacétamide, entraînait bien une diminution de l'angiogenèse intra-hépatique, mesurée par le nombre de vaisseaux présents sur les coupes de foie, mais également une aggravation de la fibrose hépatique¹⁰³. Dans ce modèle, les auteurs montraient que l'inhibition de l'angiogenèse était associée à une aggravation de l'hypoxie, qui pourrait être à l'origine de la majoration de la fibrose hépatique. En effet, l'hypoxie est capable d'activer l'expression du collagène dans les CEF et donc de stimuler la fibrose³⁰.

Dans une seconde étude plus récente, d'autres auteurs ont démontré la dualité de l'effet du traitement anti-angiogénique en fonction du temps auquel il est administré¹¹¹. Après BDL, le rongeur développe une fibrose hépatique secondaire à l'obstacle empêchant l'écoulement de la bile. Cette fibrose est réversible si l'obstacle biliaire est levé par dérivation de la bile dans les voies digestives. L'inhibition du VEGF par anticorps neutralisant permettait d'améliorer la fibrose hépatique induite par la BDL alors même qu'elle empêchait la régression de la fibrose hépatique après la levée d'obstacle biliaire¹¹¹. Ces résultats soulignent la complexité des liens entre angiogenèse et fibrogenèse hépatiques. Les conséquences de l'angiogenèse sur la fibrose pourraient varier selon le type de pathologie hépatique et aussi selon l'évolution de la pathologie (phase d'aggravation, phase de résolution).

La deuxième conséquence de l'angiogenèse porte sur l'hypertension portale. L'hypertension portale est définie par une augmentation de la pression dans la veine porte. C'est une complication fréquente la cirrhose. Elle entraîne l'apparition des voies de dérivations porto-systémiques exposant au risque d'hémorragie et contribue à l'apparition de l'ascite (épanchement liquidien dans la cavité péritonéale), exposant au risque d'infection. Ces risques constituent les causes principales de mortalité des patients cirrhotiques, expliquant ainsi l'importance de l'hypertension portale dans l'évolution de la maladie du foie. Il a été montré que l'angiogenèse contribuait à l'apparition de l'hypertension portale. En effet, chez le rat, le traitement anti-angiogénique par sorafénib a permis de diminuer la pression portale⁹⁹. Chez l'homme également, le sorafénib a montré une diminution du flux portal de 35% dans un petit groupe de 7 patients cirrhotiques traités pour leur carcinome hépatocellulaire¹⁰⁰. Néanmoins, il est fortement probable que ce soit surtout l'angiogenèse extra-hépatique, en particulier splanchnique, qui contribue majoritairement à l'hypertension portale.

III. Les microparticules

1) Généralités: définitions, mode de formation et mécanismes d'action des microparticules

Les microparticules (MP), aussi appelées microvésicules ou ectosomes, font partie du groupe des vésicules extra-cellulaires qui comprend également les exosomes et les corps apoptotiques. Même si le terme de MP est parfois employé de façon large, il est important de distinguer ces 3 entités car elles sont formées par des mécanismes différents et ne possèdent pas les mêmes propriétés ¹¹³. Le mode de formation et les principales caractéristiques des vésicules extra-cellulaires sont résumés dans la figure 7 et le tableau 7. Cependant, la définition précise de chaque type de vésicule extra-cellulaire reste un sujet de débat qui divise les experts ^{114, 115}. De plus, du fait de l'absence de standardisation dans les procédures d'isolement et les méthodes de détection, la séparation des différents types de vésicules ne s'est pas toujours faite de façon stricte dans les études du passé ¹¹⁶.

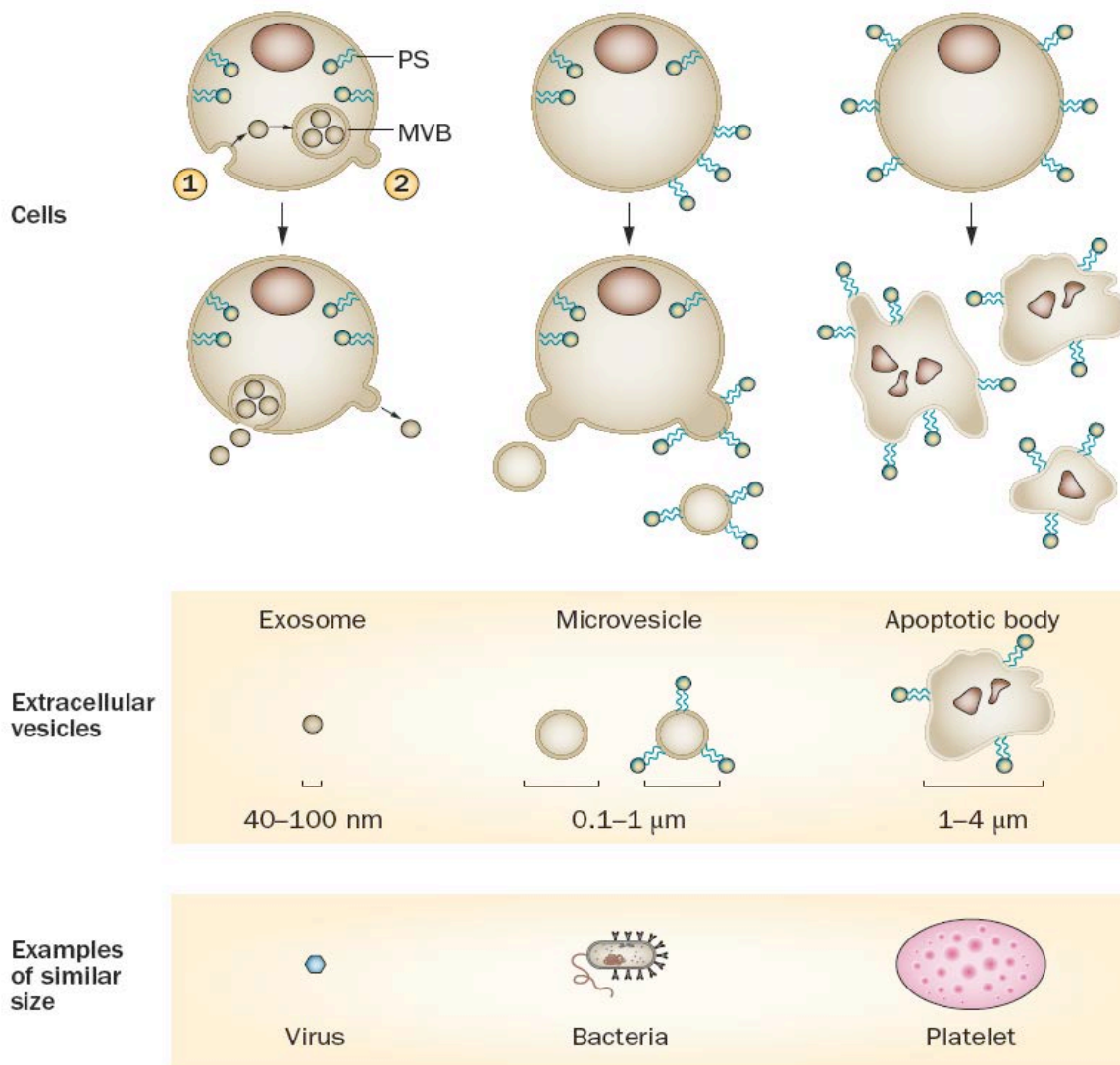


Figure 7 : Formation et caractéristiques des vésicules extra-cellulaires. ¹¹⁷

A gauche : les exosomes. Les cellules peuvent libérer des exosomes par 2 voies différentes. Dans la voie classique, des vésicules intra-cellulaires se forment par bourgeonnement interne de la membrane plasmique et forment des corps multi-vésiculaires (MVB) avant de fusionner avec la membrane plasmique pour être libérées dans le milieu extra-cellulaire. La voie directe fait sécréter des vésicules directement par la membrane plasmique sans implication des MVB. Les exosomes exposent peu ou pas la phosphatidylsérine (PS) à leur surface mais présentent d'autres marqueurs spécifiques.

Au centre : les microparticules (MP) aussi appelées microvésicules dans la littérature anglo-saxonne. En condition normale, la PS est localisée préférentiellement sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Après exposition à un stimulus, la PS est externalisée sur le feuillet externe de la membrane plasmique. Une réorganisation du cytosquelette a lieu alors pour aboutir au bourgeonnement de la membrane et à la libération des MP dans l'espace extra-cellulaire. Cependant, la formation des MP peut se faire sans externalisation de la PS puisque certaines MP sont négatives pour ce marqueur.

A droite : les corps apoptotiques. Les étapes précoces de l'apoptose sont caractérisées par des modifications du potentiel de la membrane mitochondriale et de l'asymétrie de la membrane plasmique, conduisant à l'exposition de la PS à la surface de la cellule. Au stade tardif de l'apoptose, se produit une fragmentation de l'ADN et une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique. Les cellules apoptotiques rétrécissent et se décomposent en donnant plusieurs corps apoptotiques. Comme les MP, les corps apoptotiques exposent donc la PS à leur surface et contiennent du matériel varié provenant de leur cellule mère (marqueurs membranaires, protéines, ARN, et microARN). Contrairement aux MP, ils contiennent également des fragments du noyau cellulaire.

Abréviations : MP : microparticules, MVB : corps multi-vésiculaires, PS : phosphatidylsérine.

Tableau 7: Marqueurs des vésicules extra-cellulaires. ¹¹⁷

Box 1 | Proposed markers of extracellular vesicles*

Exosomes

Alix, CD9, CD63, CD81, heat shock proteins, TSG101

Microvesicles

Phosphatidylserine (detected using annexin V or lactadherin)

Cell type marker

- Leukocyte: CD45, CD11a, CD11b
- Granulocyte: CD66b
- Monocyte: CD14
- Lymphocyte: CD4⁺ and CD8⁺ T cells, CD20 (B cell)
- Platelet: CD41a, CD42a, CD42b, CD31⁺/CD42⁺, CD61, CD62b, CD62p
- Erythrocyte: CD235a
- Endothelial cell: CD31⁺/CD41⁻, CD62e, CD51, CD105, CD144, CD146

Apoptotic bodies

Phosphatidylserine and/or DNA (detected using annexin V or propidium iodide), histones, DNA

*These markers are largely used and the best identified so far, although none of them can be considered as 100% specific.

Abbreviation: TSG, tumour susceptibility gene.

Initialement, les chercheurs ont mis en évidence la production de MP par les cellules circulantes, notamment les plaquettes, mais il a été montré ensuite que toutes les cellules de l'organisme sont théoriquement capables de sécréter des MP. Cette production peut se faire en situation physiologique mais aussi en contexte pathologique. En effet, les MP sont détectables dans le plasma de sujets sains et leur concentration est augmentée dans plusieurs situations pathologiques comme les maladies cardiovasculaires ou le cancer. Suite à une activation cellulaire ou à un stimulus pro-apoptotique, plusieurs enzymes (flipase, floppase, et scramblase) modifient leur activité induisant une externalisation des phospholipides anioniques dont la phosphatidylsérine (PS), normalement présents de façon préférentielle sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Il s'y associe une réorganisation du cytosquelette. Ces 2 événements aboutissent à la libération de MP par la cellule. Cependant,

la formation des MP peut se faire sans externalisation de la PS puisque certaines MP sont négatives pour ce marqueur.

Ainsi, les MP sont définies comme des vésicules mesurant 0,1 à 1µm de diamètre, produites par bourgeonnement de la membrane plasmique et exposant à leur surface la PS, bien que cette dernière caractéristique soit controversée. Les MP sont donc constituées d'une membrane qui correspond à la bicouche lipidique de la membrane plasmique de leur cellule mère et contiennent du cytoplasme de cette même cellule. Les MP peuvent contenir des protéines, des lipides, des ARN messagers ainsi que des microARNs. La composition des MP varie selon la cellule dont elles sont issues et selon le stimulus initiant leur formation¹¹⁸. Leur différence de contenu va se traduire par une différence dans leur effet. Par exemple, les MP isolées à partir de la plaque d'athérome de patients stimulent la prolifération des cellules endothéliales alors que les MP circulantes dans le sang des mêmes patients ne produisent pas cet effet¹¹⁹.

Alors qu'elles étaient auparavant considérées comme des débris cellulaires sans activité propre, les MP sont aujourd'hui reconnues comme des vecteurs d'information inter-cellulaire¹²⁰. En effet, par les molécules qu'elles contiennent, les MP peuvent réguler la fonction de leur cellule cible. Les MP peuvent interagir avec leur cellule cible selon plusieurs modes (figure 8). Les MP peuvent libérer les molécules solubles qu'elles contiennent ; il peut se faire une interaction de type ligand-récepteur entre un ligand exposé à la surface des MP et un récepteur à la surface de la cellule cible; la membrane de la MP peut fusionner avec la membrane de la cellule cible, lui transférant ainsi son contenu (notamment les microARNs) et apportant de nouvelles molécules trans-membranaires notamment de nouveaux récepteurs ; enfin les MP peuvent subir l'endocytose ou la phagocytose par les macrophages ou les cellules endothéliales.

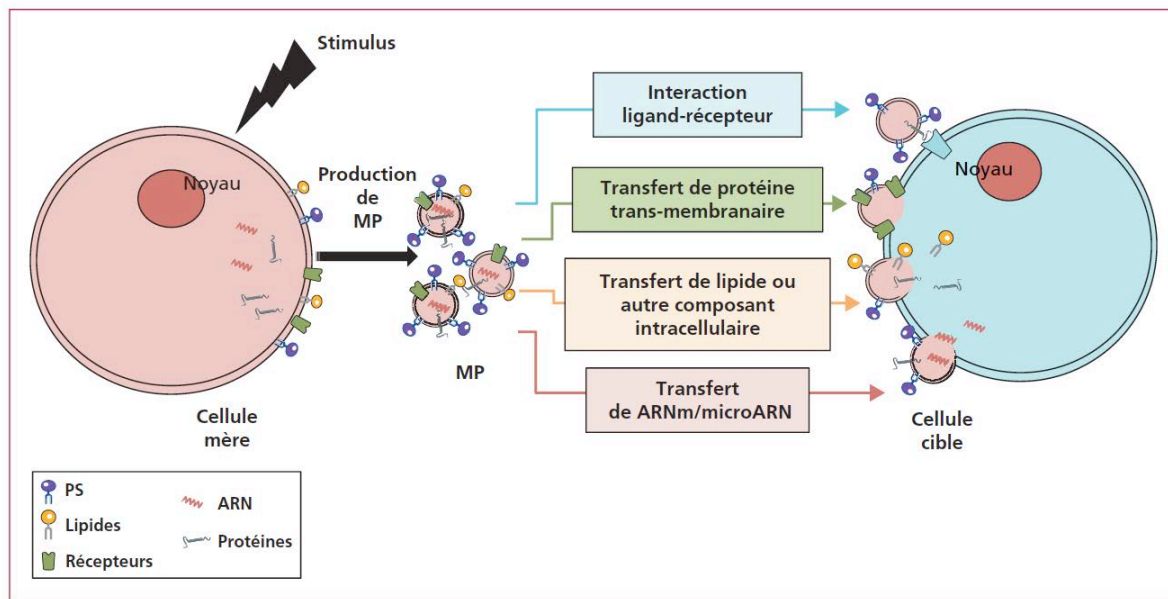


Figure 8: Mécanismes d'action des microparticules. ¹²¹

2) Méthodes d'étude des microparticules

Historiquement, les MP ont pu être décrites pour la première fois en 1967 grâce à la microscopie électronique qui montrait alors un halo de débris autour des plaquettes activées nommé « poussière de cellule » ¹²².

Depuis, les méthodes d'étude et les concepts sur les MP ont bien évolué (tableau 8). La méthode de détection des MP la plus utilisée aujourd'hui est la cytométrie en flux. Cette technique utilise un faisceau laser à travers lequel on va faire circuler une solution liquide (du plasma par exemple). Le laser va détecter tous les événements contenus dans ce liquide. Les MP vont alors être définies par les événements de taille comprise entre 0,1 et 1 μm et positifs pour le marquage par l'Annexine V ou la lactadhérine, qui peuvent se lier à la PS présente à la surface des MP. La cytométrie permet de mesurer précisément la concentration de MP présentes dans une solution mais également de déterminer l'origine cellulaire des MP détectées en utilisant des anticorps dirigés contre des marqueurs spécifiques de surface (comme CD31 pour les cellules endothéliales).

Pour étudier la composition en protéines des MP, les techniques habituelles d'*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou de *Western Blot* sont couramment utilisées.

Les MP possèdent un pouvoir pro-coagulant intrinsèque du fait de la présence à leur surface de la PS. La PS est un phospholipide chargé négativement capable d'interagir avec les différentes protéines de la coagulation chargées positivement. Ainsi, les MP offrent par leur surface une plateforme physique favorisant l'assemblage des protéines de la cascade de coagulation¹²³. Certains tests fonctionnels utilisent cette propriété pro-coagulante des MP pour les détecter et les quantifier. Les MP peuvent également exposer à leur surface le Facteur Tissulaire ou *Tissue Factor* (TF), ce qui augmente encore leur pouvoir pro-coagulant.

Enfin, des techniques d'imagerie moderne permettent de visualiser les MP comme la capture de nanoparticules par vidéo-microscopie ou la microscopie à force atomique. La microscopie à force atomique est une technique exploitant l'interaction entre les atomes pour balayer la surface d'un échantillon grâce à une sonde très fine. Les MP sont déposées sur un minéral recouvert d'un anticorps, permettant de les retenir de façon spécifique. La surface de ce minéral est balayée par la sonde du microscope qui réalise ainsi une image tridimensionnelle des MP présentes sur cette surface.

Tableau 8: Méthodes d'étude des microparticules.¹²¹

Méthode	Capacité à discriminer				Disponibilité
	Taille des MP	Nombre de MP	Origine cellulaire	Fonction des MP	
Cytométrie en flux	+	+	++	-	++
Tests fonctionnels (procoagulant)	-	+	-	++	++
Microscopie électronique	++	-	+	-	+
Tests immunologiques (ELISA, Western Blot)	-	+	++	-	++
Microscopie à force atomique*	++	++	+	-	-
Capture des nanoparticules par videomicroscopie	++	++	-	-	-

3) Rôle des microparticules dans l'angiogenèse

L'implication des MP dans l'angiogenèse a fait l'objet de plusieurs revues ^{124, 125}. Diverses études ont montré que les MP étaient capables de stimuler l'angiogenèse. Cet effet a été rapporté pour des MP produites *in vitro* à partir de cellules endothéliales ¹²⁶ ou d'EPC ¹²⁷ mais aussi pour des MP provenant d'autres cellules telles que les plaquettes ¹²⁸ ou les lymphocytes ¹²⁹. Les propriétés pro-angiogéniques ont également été rapportées pour des MP produites *in vivo* isolées à partir de muscles de membre en ischémie chez la souris ¹³⁰ ou à partir de la plaque d'athérome de patients ¹¹⁹ ou encore pour des MP circulantes isolées à partir du plasma de souris ¹³¹.

Il existe différents mécanismes par lesquels les MP peuvent agir sur les cellules endothéliales pour favoriser l'angiogenèse. Tout d'abord, les MP peuvent apporter les facteurs de croissance pro-angiogéniques, notamment le VEGF. Par exemple, les MP produites *in vitro* par les myofibroblastes de peau humaine contenaient du VEGF et étaient capables de stimuler la croissance des cellules endothéliales ¹³².

Les corps vitrés des yeux de patients atteints de rétinopathie diabétique proliférative contenaient des MP provenant des plaquettes, des cellules endothéliales et des cellules nerveuses de la rétine. Ces MP étaient capables de stimuler la prolifération des cellules endothéliales et la formation de nouveaux vaisseaux, bien qu'elles ne contenaient pas de VEGF ¹³³. La stimulation de la voie VEGF par les MP peut se faire de manière indirecte. Les MP contenant les ligand Sonic Hedgehog (Shh) produites par une lignée cellulaire de lymphocytes T, augmentaient la tubulogénèse des cellules endothéliales ¹³⁴. Ces MP induisaient l'expression de facteurs pro-angiogéniques dont le VEGF par les cellules endothéliales et ce de façon dépendante de l'action de Shh. En effet, la stimulation de la tubulogénèse et l'expression du VEGF induite par les MP était réversée par le blocage de Shh par SiRNA ou par inhibiteur pharmacologique ¹³⁴. De la même façon, les MP produites par des lignées humaines de cellules tumorales et contenant une forme mutée hyperactive du récepteur d'EGF (EGFR) pouvaient être captées par les cellules endothéliales, leur transférant ainsi ce récepteur. Ce transfert d'EGFR s'accompagnait de l'augmentation de l'expression de VEGF et de l'activation autocrine de VEGFR-2 dans les cellules endothéliales ¹³⁵.

Une autre étude a montré que les MP peuvent stimuler la fonction angiogénique des cellules endothéliales par l'action du TF ¹³⁶. En effet, le milieu conditionné, c'est à dire le surnageant de culture contenant tout ce qui est sécrété par les cellules, provenant des cellules mésangiales du rein (péricyte des cellules endothéliales dans le glomérule rénal) renfermait

des MP contenant du TF. Ce milieu conditionné était capable d'augmenter la formation de capillaires par les cellules endothéliales *in vitro*. La déplétion de ce milieu en MP diminuait son pouvoir pro-angiogénique, prouvant ainsi l'implication des MP. De plus, la pré-incubation de ce milieu conditionné avec un anticorps neutralisant anti-TF, mais pas avec un anti-VEGF, diminuait son effet de stimulation de l'angiogénèse. L'ensemble de ces résultats n'était retrouvé que quand les cellules mésangiales étaient soumises à des fortes concentrations de glucose ; ainsi ce mécanisme interviendrait dans la physiopathologie de la néphropathie vasculaire diabétique ¹³⁶.

L'action des MP sur les cellules endothéliales peut également se faire par transfert d'ARN messagers, comme cela a été montré pour les MP provenant des EPC ¹²⁷. En effet, ces MP étaient capables de s'incorporer aux cellules endothéliales et de stimuler l'angiogénèse à la fois dans des tests *in vitro* et *in vivo*. Leur action pro-angiogénique était inhibée lorsque ces MP étaient incubées avec de la RNase ¹²⁷.

D'autre part, les MP peuvent également stimuler l'angiogénèse en agissant sur d'autres cellules que les cellules endothéliales. Premièrement, les MP peuvent agir sur les EPC. En effet, les MP circulantes dans le plasma des souris étaient capables d'induire la différenciation des EPCs en cellules endothéliales matures, de façon dépendante de la voie PPAR- α ¹³¹. Les MP peuvent également activer les fibroblastes, comme cela a été montré pour les MP libérées par les cellules de cancer de prostate qui peuvent activer les fibroblastes péri-tumoraux pour induire la dégradation de la matrice extra-cellulaire, favorisant ainsi l'angiogénèse tumorale ¹³⁷.

4) Rôle des microparticules dans les maladies du foie

Le rôle des MP dans les maladies du foie a fait l'objet de 2 revues publiées lors de ce travail de thèse ^{117, 121}.

Plusieurs études ont rapporté l'augmentation des concentrations de certaines MP dans le plasma de patients atteints de maladie du foie (tableau 9).

Tableau 9 : Etude des MP circulantes chez les patients atteints de maladie du foie.¹¹⁷

Liver disease (number of patients)	Method	Analysed subpopulations of MVs	Potential interest of MVs as a biomarker	Reference
Hepatitis B (n=11) Hepatitis C (n=25)	FCM	Platelets	Marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C	Fusegawa <i>et al.</i> (2002) ¹⁹
Hepatitis C (n=16) HCC (n=8)	FCM	Annexin V-positive, endothelial, hepatocyte	Marker of HCC and post-transplantation outcome	Brodsky <i>et al.</i> (2008) ²⁰
Hepatitis B and C related cirrhosis (n=60)	FCM	Platelets	ND	Sayed <i>et al.</i> (2010) ²¹
Hepatitis C (n=21)	FCM	Annexin V-positive, lymphocyte, macrophages, neutrophils, platelets	Marker of liver inflammation and fibrosis	Kornek <i>et al.</i> (2011) ²²
Alcoholic liver disease (n=20) Hepatitis C related cirrhosis (n=9)	FCM	Platelets	ND	Ogasawara <i>et al.</i> (2005) ²³
Hepatitis C (n=20) Alcoholic cirrhosis (n=71)	FCM	Annexin V-positive, leukoendothelial, lymphocyte, platelets, hepatocyte, erythrocyte	Marker of cirrhosis severity	Rautou <i>et al.</i> (2012) ²⁴
NAFLD (n=67) Hepatitis C (n=42)	FCM	Annexin V-positive, lymphocytes, natural killer T cells or macrophage, neutrophils, platelets	Marker of liver inflammation	Kornek <i>et al.</i> (2012) ²⁵
Liver transplantation (n=19)	FCM	Platelets	Marker of ischaemia-reperfusion injury	Esch <i>et al.</i> (2010) ²⁶
Acute liver failure (n=20)	MV PS activity assay	PS-positive	ND	Agarwal <i>et al.</i> (2012) ²⁷
Acute liver failure with (n=20) and without (n=20) kidney injury	MV PS activity assay	PS-positive	ND	Agarwal <i>et al.</i> (2013) ²⁸
Acute liver failure (n=50)	FCM; ISADE™; MV tissue factor activity	Annexin V-positive, endothelial, hepatocyte, monocytes, platelet, tissue-factor-positive	Prognostic marker	Stravitz <i>et al.</i> (2013) ²⁹
Acute liver failure (n=5) Acute-on-chronic liver failure (n=5)	FCM	Hematopoietic stem cells	Marker of acute liver insults	Schmelze <i>et al.</i> (2013) ³⁰

Abbreviations: FCM, flow cytometry; HCC, hepatocellular carcinoma; ISADE™, Invitrox sizing, antigen detection and enumeration (Invitrox, NC, USA); MV, microvesicle; ND, not determined; PS, phosphatidylserine.

Cette augmentation de la concentration des MP résulterait d'une production accrue et d'une clairance diminuée des MP chez ces patients. En effet, plusieurs causes d'hépatopathies entraînent la production de MP, comme la consommation d'alcool, l'infection virale, les critères du syndrome métabolique, incluant l'obésité, la dyslipidémie et même la sédentarité¹¹⁷. Le foie pathologique, lui-même, est très probablement à l'origine de la libération des MP puisqu'il est le siège de phénomènes induisant la formation des MP tels que l'endotoxémie, le stress oxydatif, l'apoptose ou l'activation cellulaire. La détection dans le plasma des patients de MP d'origine hépatocytaire atteste de cette production de MP par le foie¹³⁸. D'autre part, la clairance des MP est susceptible d'être altérée en cas de maladie du foie. En effet, en condition physiologique, cette clairance est assurée par les macrophages du foie et de la rate. Or la fonction des macrophages est vraisemblablement diminuée en cas d'hépatopathie.

Les MP interviennent à plusieurs étapes de la physiopathologie des maladies du foie et de leurs complications.

Premièrement, les MP sont impliquées dans la fibrogenèse. Les MP provenant des lymphocytes T et présentes dans le sang des patients atteints d'hépatite chronique virale C sont capables d'agir sur les CEF avec un effet anti-fibrosant¹³⁹. En effet, les MP, produites *in vitro* par les lymphocytes T isolés du sang de ces patients, étaient capables de fusionner avec la membrane de CEF, aboutissant à la régulation positive de l'expression des gènes anti-fibrosants comme les MMP et à la régulation négative des gènes pro-fibrosants comme le collagène I et le TGF- β . Ces résultats sont en accord avec des données précédentes de la littérature qui montraient que les MP pouvaient induire l'expression de MMP dans les fibroblastes ou bien encore contenir directement des MMP. Les MP pourraient également exercer un effet anti-fibrosant dans le foie par les microARNs qu'elles contiennent comme cela a été montré pour la fibrose rénale¹⁴⁰. D'autres résultats montrent que certaines MP pourraient au contraire favoriser la fibrose hépatique. En effet, par leur pouvoir pro-angiogénique, les MP pourraient aggraver la fibrose. Une étude a montré que les hépatocytes exposés à des acides gras saturés produisaient des MP capables de stimuler l'angiogénèse *in vitro* et *in vivo*, de façon dépendante de la Vanine-1¹⁴¹. Ces mêmes MP étaient retrouvées en concentration importante chez la souris avec une NAFLD induite par le régime, modèle dans lequel le foie présente une fibrose associée à une angiogénèse marquée.

Les MP interviennent également dans la genèse de l'hypertension portale. Cette complication sévère de la cirrhose résulte à la fois d'une augmentation des résistances vasculaires intra-hépatiques et d'une vasodilatation artérielle splanchnique. Les MP sont susceptibles de participer à ces 2 mécanismes. Premièrement, il a été montré que les CEF produisaient des MP contenant le ligand Shh qui étaient capables de moduler l'expression de certains gènes dans les cellules endothéliales sinusoidales, contribuant probablement au remodelage sinusoidal causant l'augmentation des résistances vasculaires intra-hépatiques¹⁴². Deuxièmement, la vasodilatation splanchnique est causée par une augmentation des vasodilatateurs ainsi que par une réponse diminuée aux vasoconstricteurs, à laquelle pourraient participer les MP. En effet, les patients atteints d'une cirrhose décompensée, présentaient des concentrations élevées de MP d'origine leuco-endothéliale, leucocytaire, érythrocytaire et hépatocytaire dans leur plasma¹³⁸. Ces MP altéraient la réponse des anneaux aortiques aux agents vasoconstricteurs et diminuaient la pression artérielle des souris, *via* le transfert de phospholipides aux cellules endothéliales¹³⁸.

Les MP, de par leur propriété pro-coagulante pourraient participer aux troubles de la coagulation associées aux maladies du foie. En effet, la cirrhose comme l'insuffisance hépatocellulaire aigüe sont associées à un déséquilibre de la coagulation en faveur du statut pro-coagulant. L'activité pro-coagulante des MP contenant le TF ou seulement la PS a été retrouvée respectivement 38 fois et 4 fois plus élevée chez les patients atteints d'insuffisance hépatique aigüe par rapport aux sujets contrôles ^{143, 144}. Dans ce contexte, les concentrations plasmatiques des MP étaient significativement corrélées au pronostic des malades, faisant des MP un potentiel biomarqueur de la gravité de la pathologie hépatique.

Enfin, les MP interviennent très probablement dans la physiopathologie du carcinome hépatocellulaire, complication majeure de la cirrhose. Bien que le rôle des MP ait été largement étudié dans le cancer ¹⁴⁵, peu d'études se sont intéressées aux MP dans le cadre spécifique du carcinome hépatocellulaire. Une étude pilote a rapporté l'association statistique entre la taille du carcinome hépatocellulaire et le taux plasmatique de MP provenant des cellules endothéliales et des hépatocytes ¹⁴⁶. De plus, dans cette étude, la concentration des MP était significativement diminuée après résection de la tumeur hépatique ¹⁴⁶. Le carcinome hépatocellulaire est une tumeur richement vascularisée ; il est donc très probable que les MP interviennent dans sa physiopathologie du fait de leur pouvoir pro-angiogénique (voir paragraphe précédent). Par ailleurs, il a été montré que les MP favorisaient l'acquisition d'un phénotype métastatique par les cellules du carcinome hépatocellulaire ¹⁴⁷. En effet, les MP secrétées *in vitro* par des cellules de l'immunité innée étaient captées par les cellules de carcinome hépatocellulaire chez lesquelles elles stimulaient la migration, l'invasion et l'adhésion à l'endothélium *in vitro* ainsi que la formation de métastases quand elles étaient injectées chez la souris. Cette action était effectuée par l'intégrine α M-intégrine- β 2, qui était transférée des cellules immunitaires vers les cellules tumorales *via* les MP. Certaines MP peuvent au contraire avoir un effet anti-tumoral, comme cela a été démontré pour les MP produites par des cellules souches du foie adulte qui étaient capables d'inhiber la prolifération et d'induire l'apoptose des cellules de carcinome hépatocellulaire ¹⁴⁸.

Deuxième Partie

Résultats des travaux

La plupart de nos résultats ont été publiés dans notre article intitulé « Portal myofibroblasts promote vascular remodeling underlying cirrhosis formation through the release of microparticles »²⁵. Néanmoins, ce manuscrit expose également des résultats non publiés qui apparaîtront en gris dans le texte.

I. Caractérisation de notre modèle de MFP

1) Isolement des canaux biliaires

Pour étudier les myofibroblastes portaux (MFP) et leur implication dans l'angiogenèse intra-hépatique, nous avons utilisé un modèle de cellules primaires de rat. Dans ce modèle, les MFP sont obtenus à partir de la culture d'explants de canaux biliaires de foie de rat sain³⁵. La technique d'isolement est détaillée dans l'annexe 1. Elle peut être résumée en plusieurs étapes :

- 1- Digestion enzymatique *in situ* du foie du rat par perfusion de la veine porte par une solution d'EDTA puis par une solution de libérase.
- 2- Isolement de l'arbre biliaire du reste du parenchyme hépatique et dissociation mécanique.
- 3- Digestion enzymatique de l'arbre biliaire par plusieurs bains successifs dans des solutions contenant diverses enzymes : libérase, pronase, hyaluronidase, DNase.
- 4- Filtration de la solution cellulaire obtenue sur des filtres de 100µm et sur des filtres de 40µm pour ne garder que les segments de canaux biliaires mesurant entre 40 et 100µm.

La pureté de l'isolement des canaux biliaires a tout d'abord été évaluée par l'aspect morphologique au microscope optique. On pouvait observer des structures typiques des canaux biliaires correspondant à des amas de petites cellules denses, sans cellule individuelle. De plus, l'absence de CEF, l'autre précurseur principal de myofibroblaste hépatique, était assurée par le fait que l'isolement ne provenait que de l'arbre biliaire, or les CEF ne sont pas situés à proximité des canaux biliaires, et était vérifiée par l'absence d'auto-fluorescence sous excitation par les UV à 328nm de longueur d'onde (figure 9).

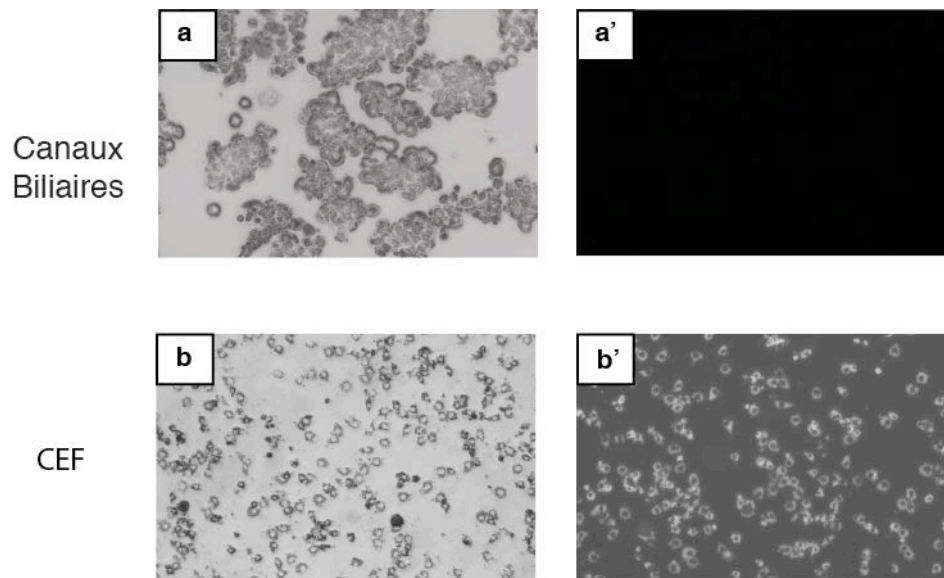


Figure 9 : Apparence des canaux biliaires à l'isolement et comparaison à l'isolement des CEF.

Photographies des cellules obtenues immédiatement après leur isolement à partir de foie de rat sain, observées au microscope à contraste de phase (a, b) ou au microscope à fluorescence après excitation par UV de 328 nm de longueur d'onde (a', b').

2) Culture des MFP

Les explants de canaux biliaires ont été ensemencés sur des supports plastiques avec du milieu adapté à la culture des myofibroblastes primaires et composé DMEM avec 10% de sérum de veau foetal (SVF), 1% d'Hépès 1M et 100UI-100mg/mL de pénicilline-streptomycine. Ils ont été cultivés dans un incubateur à 37°C, avec 5% de CO₂.

Immédiatement après leur isolement, la composition des canaux biliaires était semblable à celle retrouvée *in vivo* : ils étaient composés majoritairement de cellules épithéliales, les cholangiocytes, et de rares cellules mésenchymateuses, permettant la structure physique du canal biliaire. La mise en culture des explants de canaux biliaires allait en modifier la population cellulaire. En effet, lorsque l'on observait les cellules au microscope, on pouvait remarquer que le phénotype des cellules changeait au fur et à mesure de la culture : les structures typiques des canaux biliaires (amas de petites cellules denses) présentes initialement disparaissaient alors qu'apparaissaient et proliféraient des cellules de faible densité qui émettaient des prolongements cytoplasmiques, adoptant le phénotype de

myofibroblaste (figure 10). Les cellules parvenues à confluence avant et après passage cellulaire, respectivement appelées P0 et P1, étaient ainsi constituées d'une population homogène de cellules d'aspect myofibroblastique (figure 10). Puisqu'ils provenaient de l'activation des cellules mésenchymateuses présentes autour des canaux biliaires, ces myofibroblastes correspondaient donc aux myofibroblastes portaux (MFP).

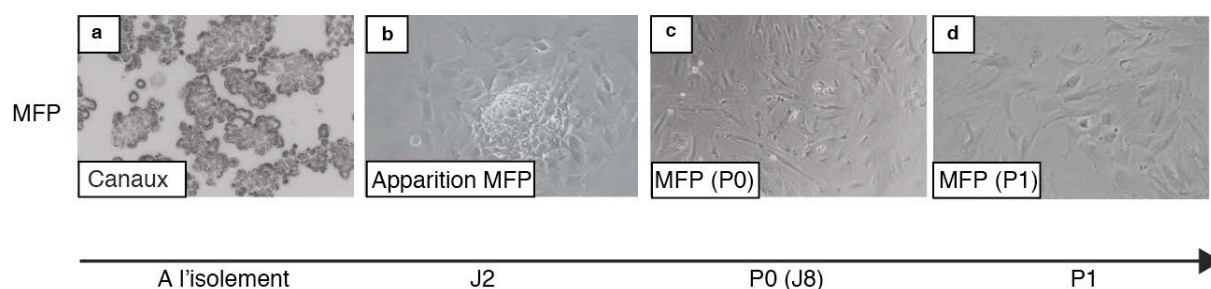


Figure 10 : La culture des canaux biliaires aboutit à l'apparition des myofibroblastes portaux.

Photographies des cellules primaires isolées à partir de foie de rat sain, acquises au microscope à contraste de phase, à différents temps de culture après leur isolement. Les canaux biliaires (a) disparaissent progressivement en même temps qu'apparaissent et prolifèrent les myofibroblastes portaux (b-d).

Pour confirmer ces données de morphologie et caractériser de façon précise les cellules présentes au fur et à mesure de la culture, nous avons étudié l'expression de marqueurs spécifiques des différents types cellulaires à la fois au niveau de l'ARNm par RT-PCR quantitative et au niveau de la protéine par immuno-fluorescence et par Western Blot. Comme marqueur de myofibroblaste, nous avons utilisé α -sma et collagène I (coll1a1). Comme marqueur de cholangiocyte, nous avons utilisé le CK19 (cytokératine 19) et le panCK (pancytokératine).

Pour réaliser la RT-PCR, l'ARN total a été soumis à la transcription inverse avec des amorces aléatoires d'hexamères et 200 Unités de Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen,) pendant 1 heure à 42°C. La PCR quantitative en temps réel a été réalisée en utilisant le Sybr Green Master Mix dans l'appareil Mx3000P (Agilent Technologies) ou Lightcycler 480 (Roche). Les niveaux d'expression du gène d'intérêt étaient exprimés de façon relative par rapport à ceux d'un gène de référence (18S) selon la

méthode de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les séquences des amorces utilisées apparaissent dans le tableau 10. Pour les analyses statistiques, nous avons utilisé le test de Student pour comparer les différents groupes. Les résultats étaient considérés significatifs pour une valeur de $p < 0,05$.

Tableau 10 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR.

Gène	N° GenBank	Amorce Sens	Amorce Anti-sens
Rat			
α -SMA	NM_031004.2	GGGACGACATGGAAAAGATCTG	GGTTGGCCTTAGGGTTCAGC
<i>Colla1</i>	NM_053304.1	TGAGCCAGCAGATTGAGAACA	GGGTCGATCCAGTACTCTCCG
<i>Coll5a1</i>	NM_001100535	GCCCCCTACTTCATCCTCTC	CAGTACGGACCTCCAGGGTA
<i>Fibulin-2</i>	NC_005103	GAACCGCCAGTAGCAGGTAG	GCCTGACTTAGGCAGAGGTG
<i>Vegfa</i>	NM_031836.2	TGTTTGACTGCTGTGGACTT	GACTTCGGCCTCTCTAAGAA
<i>Ang-1</i>	NM_053546.1	ACACCGTGAGGATGGAAGCCT	ACCAGAGGGATTCCCAAACCCAT T
<i>PIGF</i>	NM_053595.2	AGGAACCCACCTGTGATGCTGT	TGAGCTGGGTGTGGGTCTCTCC
<i>NRP-1</i>	NM_145098.2	AGCTGGACCCACGACACCCA	TGGTGCCTCCTGTGAGCTGGA
vWf	NM_053889.1	CCTTGTGAAGTGGCTCGTCT	GCAAGTTGCAGTTGACCAGG
18S	NR_046237.1	GAGCGAAAGCATTGCCAAG	GGCATCGTTTATGGTCGGAA
CK19	AY464140.1	ACGCGGTGGAAGTTTTAGTG	CGAATCTTCACCTCCAGCTC
Human			
<i>COL15A1</i>	NM_001855.4	GCAGGAGGCAGACGGAGTAG	GAGTTGGAGGTGTGTTTATGGGTT
vWF	NM_000552.3	CTCCACGCCTACATCGG	GCGGTCGATCTTGCTGAAG
18S	M10098.1	GAGCGAAAGCATTGCCAAG	GGCATCGTTTATGGTCGGAA

Pour l'immuno-fluorescence, les cellules ont été fixées par du paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes puis bloquées et perméabilisées par une solution d'albumine 2% (Roche) préparée avec Triton 100X 0,1% (Sigma-Aldrich) pendant une heure. Les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires anti- α -SMA (1A4, 1/100), de Dako ou anti-panCK (sc-8018, 1/10) de Santa Cruz Biotechnology à 4°C pendant la nuit, puis avec l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome AlexaFluor 488 ou 568 (Invitrogen) dilué au 1/200ème dans de l'albumine 2%, à température ambiante pendant 1 heure. Le marquage des noyaux s'est fait en utilisant le Draq5 (Biostatus; Ozyme), dilué au 1/1000ème pendant 5 minutes. Les cellules ont finalement été examinées avec un microscope confocal SP2 (Leica).

Les résultats de l'analyse de la PCR (figure 11) et des images d'immuno-fluorescence (figure 12) montraient que l'expression des marqueurs de cholangiocytes diminuait alors que parallèlement l'expression des marqueurs de myofibroblastes augmentait au cours de la culture. A P1, toutes les cellules exprimaient α -sma, montrant qu'il s'agissait bien de myofibroblastes (figure 12). Le niveau d'expression d' α -sma dans les MFP à P1 était comparable à celui retrouvé dans les CEF-MF, à P1 (figure 13).

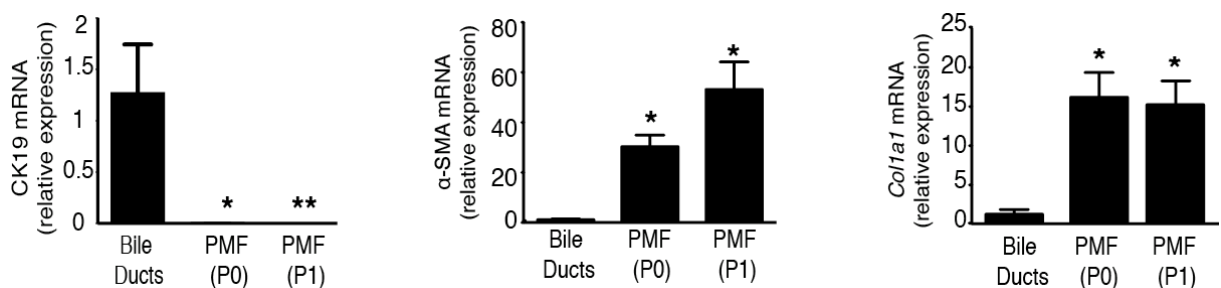


Figure 11 : Caractérisation par PCR du modèle de MFP au cours de la culture.

L'expression de CK19, α -sma et Col1a1 a été analysée par RT-PCR dans les canaux biliaires fraîchement isolés de foie de rat et dans les MFP obtenus à partir de la culture de ces canaux, à P0 et à P1. Les résultats sont exprimés en niveau d'expression d'ARNm rapporté à celui retrouvé dans les canaux biliaires et représentent les moyennes +/- SEM de 4 à 13 préparations cellulaires. * $p < 0,05$ par rapport aux canaux biliaires, ** $p < 0,05$ par rapport aux canaux biliaires et aux MFP à P0.

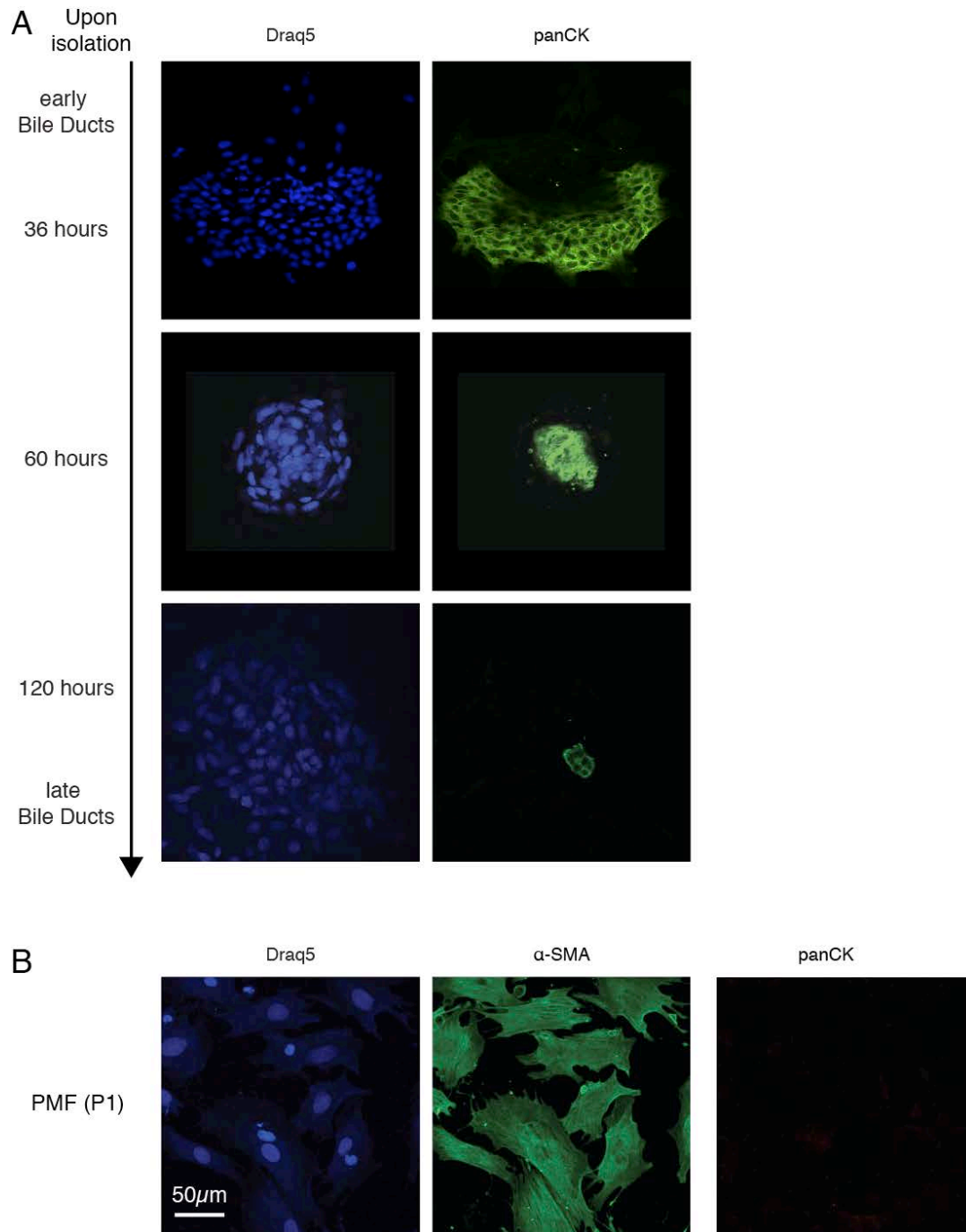


Figure 12 : Caractérisation par immuno-fluorescence du modèle de MFP au cours de la culture.

L'expression de panCK et d' α -sma a été analysée par immuno-fluorescence dans les canaux biliaires à différents temps de culture après leur isolement. Les images montrent une disparition progressive des cellules épithéliales (positives pour PanCK) pour ne laisser place qu'à des cellules positives pour α -sma à P1. Les images sont des coupes z-stack représentatives d'au moins 6 isolements indépendants.

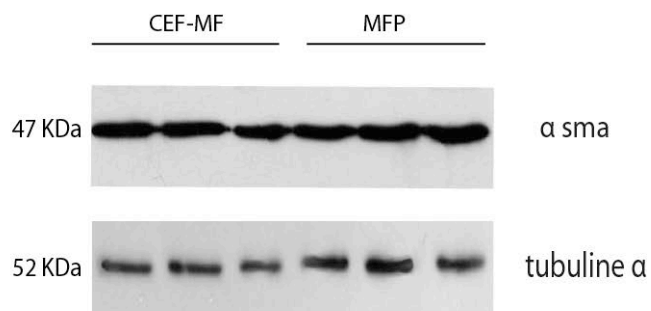


Figure 13 : Expression d' α -sma par les CEF-MF et les MFP.

Western Blot des lysats cellulaires de 3 isolements indépendants de cellules étoilées du foie et de myofibroblastes portaux à P1 montrant leur expression d' α -sma. La tubuline- α est utilisée comme contrôle.

Au total, la caractérisation de notre modèle cellulaire nous a permis de conclure que la culture des canaux biliaires aboutissait bien à l'obtention de myofibroblastes, ne dérivant pas des CEF mais des cellules mésenchymateuses présentes autour des canaux biliaires, correspondant donc aux MFP.

II. Le collagène XV est un bon marqueur des MFP

1) Identification du collagène XV par analyse du transcriptome

L'analyse comparative du transcriptome des MFP et CEF-MF primaires de rat a permis de mettre en évidence 3571 gènes sur-exprimés dans les MFP par rapport aux CEF-MF (Thèse de Nelly Bosselut, 2010). La classification fonctionnelle de ces gènes a été faite par le système d'analyse Gene Ontology (GO). Cette analyse a montré que les gènes sur-exprimés dans les MFP étaient impliqués dans le cycle cellulaire et la réplication (figure 14, pannel de gauche). Parmi ces gènes, le collagène XV (*Col15a1*) était exprimé 16 fois plus dans les MFP que dans les CEF-MF. L'analyse par GO a rapporté que les gènes co-exprimés avec *Col15a1* avaient un rôle dans la régulation de la pression artérielle et de la prolifération des cellules musculaires lisses (figure 14, pannel de droite), laissant supposer l'existence d'une fonction vasculaire pour les MFP.

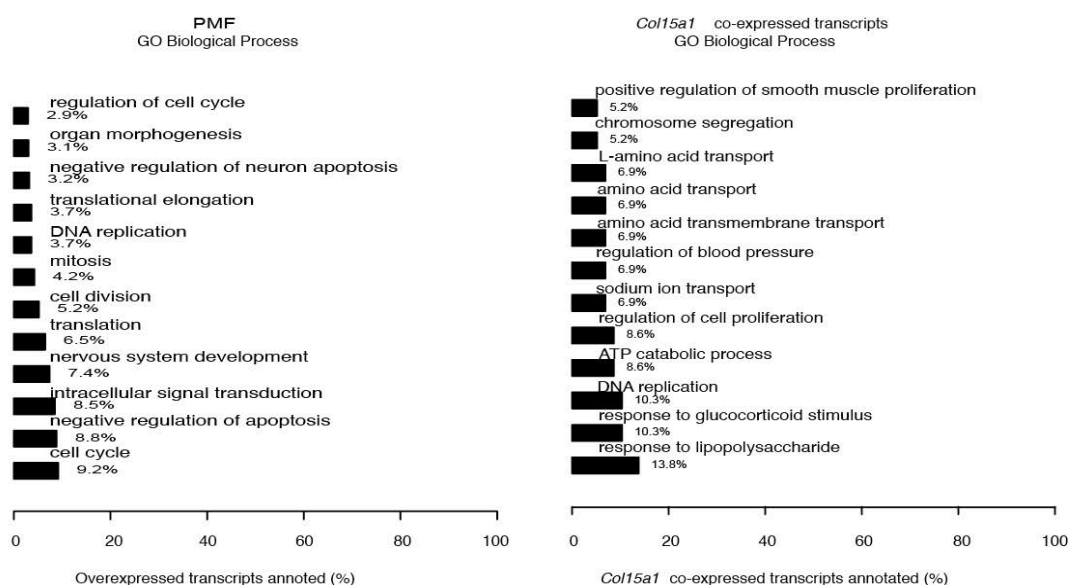


Figure 14 : Analyse du transcriptome des MFP.

Résultats de l'analyse par Gene Ontology(GO) de la fonction des gènes sur-exprimés dans les MFP par rapport aux CEF-MF (pannel de gauche) et des gènes co-exprimés avec le *Col15a1* dans les MFP (pannel de droite).

2) Expression du collagène XV par notre modèle cellulaire

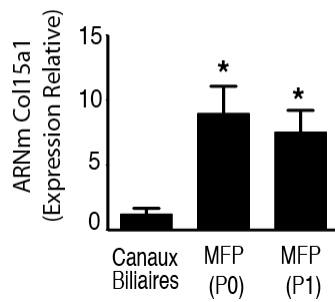
Pour valider col15a1 comme nouveau marqueur des MFP, nous avons analysé son expression dans notre modèle de MFP au cours de la culture, par les techniques de RT-PCR et d'immuno-fluorescence, exposées précédemment. Pour cela, nous avons utilisé l'anticorps primaire anti-COL15A1(HPA017913, 1/50) de chez Sigma-Aldrich.

Les analyses de PCR ont montré qu'au début de la culture, l'expression de Col15a1 était faible puis augmentait en même temps que celle des autres marqueurs de myofibroblastes, Col1a1 et α -sma. Contrairement à α -sma, l'expression de Col15a1 n'augmentait pas entre P0 et P1, suggérant que le niveau d'expression de Col15a1 n'était pas lié à la différenciation myofibroblastique (figure 15).

Le double marquage par Col15a1 et PanCK a montré que juste après l'isolement, les préparations de canaux biliaires contenaient majoritairement des cholangiocytes mais également quelques cellules distinctes des cholangiocytes, car n'exprimant pas PanCK et positives pour Col15a1 (figure 15). A un stade de culture plus tardif, toutes les cellules exprimaient Col15a1. A P1, la majorité des MFP exprimaient le Col15a1, bien que l'intensité du marquage semble varier d'une cellule à l'autre (figure 15). Ces résultats montraient donc que Col15a1 était exprimé à la fois par les MFP activés en myofibroblastes et par leurs précurseurs, présents en faible nombre dans les explants de canaux biliaires, juste après l'isolement.

De façon importante, cette expérience a montré qu'à aucun moment, une même cellule n'a exprimé à la fois PanCK et Col15a1, plaidant donc contre la survenue d'une transition épithélio-mésenchymateuse des cholangiocytes en myofibroblastes dans notre modèle.

A



B

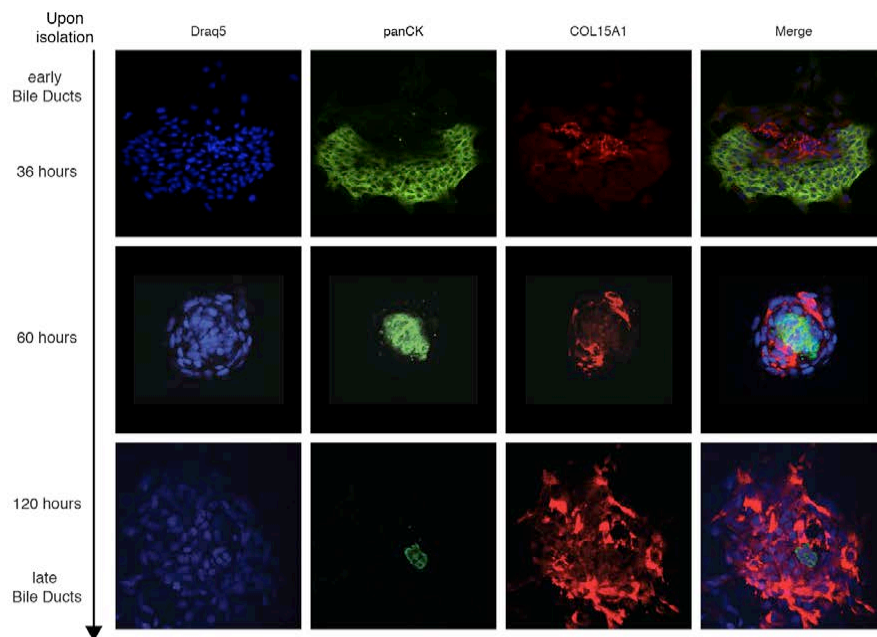


Figure 15 : Expression de Col15a1 dans notre modèle de MFP.

L'expression de Col15a1 a été analysée A) par RT-PCR dans les canaux biliaires fraîchement isolés de foie de rat et dans les MFP obtenus à partir de la culture de ces canaux, à P0 et à P1. Les résultats sont exprimés en niveau d'expression d'ARNm rapporté à celui retrouvé dans les canaux biliaires et représentent les moyennes +/- SEM de 4 à 13 préparations cellulaires. * $p < 0,05$ par rapport aux canaux biliaires ; B) par double immunofluorescence avec panCK dans les canaux biliaires à différents temps de culture après leur isolement, montrant l'expansion des cellules positives pour COL15A1, concomitante de la disparition des cellules épithéliales, sans aucun chevauchement entre les 2 populations cellulaires. Les images sont des photographies des coupes z-stack représentatives d'au moins 6 isolements différents.

3) Expression du Collagène XV par les autres cellules du foie

Pour s'assurer que Col15a1 était bien spécifique des MFP, nous avons cherché à évaluer son expression dans les autres types cellulaires du foie. Pour ce faire, nous avons isolé à partir du foie de rat : les hépatocyte, les CEF, les cellules endothéliales sinusoidales (LSEC) et les cellules de Kupffer. Les CEF ont été analysées juste après l'isolement alors appelées CEF quiescentes (CEFq) et après le premier passage alors qu'elles étaient activées en myofibroblastes (CEF-MF). Dans chacun de ces types cellulaires, nous avons mesuré l'expression du Col15a1 par RT-PCR.

Les résultats ont montré que l'expression de Col15a1 dans tous les types cellulaires était faible et négligeable par rapport à celle des MFP (figure 16 A). Le but initial de l'identification d'un marqueur des MFP était de pouvoir distinguer les 2 différents types de myofibroblastes donc le résultat le plus important était la comparaison de l'expression de Col15a1 entre les MFP et les CEF-MF. Pour confirmer les résultats de la PCR qui mesuraient l'expression du gène du Col15a1, nous avons donc également évalué l'expression de la protéine COL15A1, par immuno-fluorescence. Les images des cellules ont confirmé que, contrairement aux MFP, les CEF-MF n'exprimaient pas la protéine COL15a1 (figure 16 B).

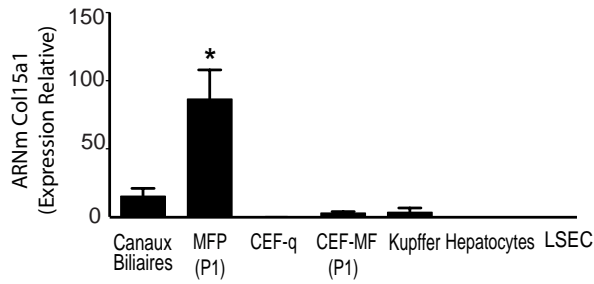
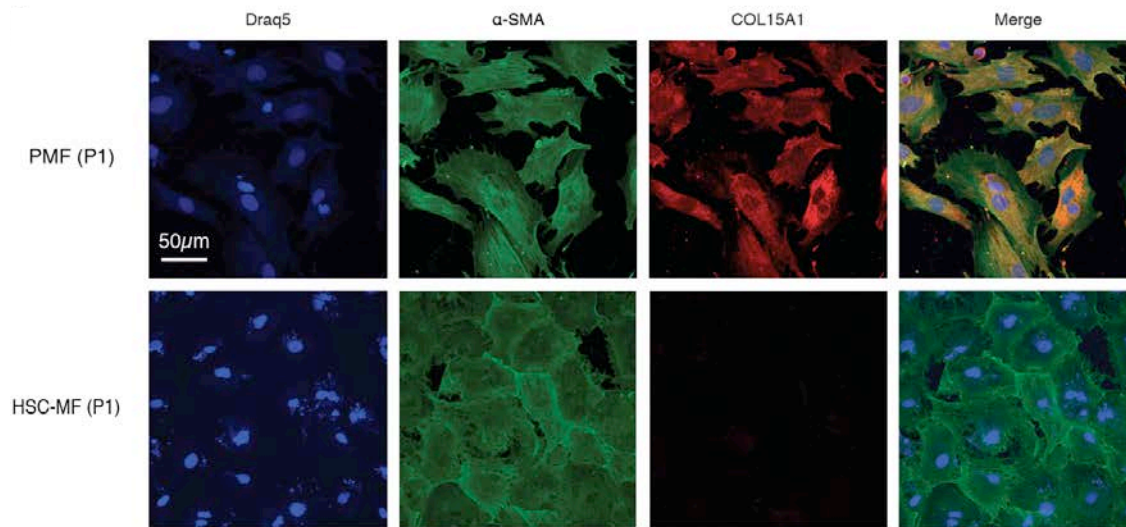
A**B**

Figure 16 : Expression du Col15a1 par les MFP et par les autres cellules du foie.

L'expression de Col15a1 a été analysée A) par RT-PCR dans les différents types cellulaires de foie de rat, incluant les canaux biliaires fraîchement isolés, les MFP à P1, les CEF quiescentes (CEFq), les CEF-MF à P1, les cellules de Kupffer, les hépatocytes et les LSEC. Les résultats sont exprimés en niveau d'expression d'ARNm rapporté à celui retrouvé dans les CEF-MF et représentent les moyennes +/- SEM de 4 à 13 préparations cellulaires. * $p < 0,05$ par rapport aux autres types cellulaires; B) par double immuno-fluorescence avec α -sma dans les MFP et les CEF-MF à P1, montrant l'expression de COL15A1 dans tous les MFP positifs pour α -sma alors que cette expression était indétectable dans les CEF-MF positives pour α -sma. Barre d'échelle : 50 μ m.

4) Comparaison du collagène XV avec la Fibuline-2

Puisque la Fibuline-2 a été rapportée comme marqueur des MFP par des travaux précédents, nous avons souhaité comparer notre nouveau marqueur le Col15a1 à la Fibuline-2. A nouveau, nous avons utilisé les techniques de RT-PCR et d'immuno-fluorescence, avec l'anticorps primaire anti-Fibuline-2 (HPA001934, 1/25) de chez Sigma-Aldrich.

L'analyse de la PCR a montré que le Col15a1 était plus discriminant que la Fibuline-2 pour distinguer les MFP des CEF-MF (figure 17 A). D'autre part, contrairement à ce que l'on observait pour le Col15a1, l'expression de la fibuline-2 dans les MFP était augmentée entre P0 et P1, suggérant que l'expression de la Fibuline-2 était, comme pour α -sma, dépendante de l'activation myofibroblastique (figure 17 B). Enfin, l'étude par immuno-fluorescence a montré que la protéine de la Fibuline-2 était détectée non seulement dans les MFP, comme attendu mais également dans les CEF-MF (figure 17 C). Ainsi, contrairement à Col15a1, la Fibuline-2 ne semble pas être un marqueur assez spécifique pour pouvoir différencier les 2 types de myofibroblastes.

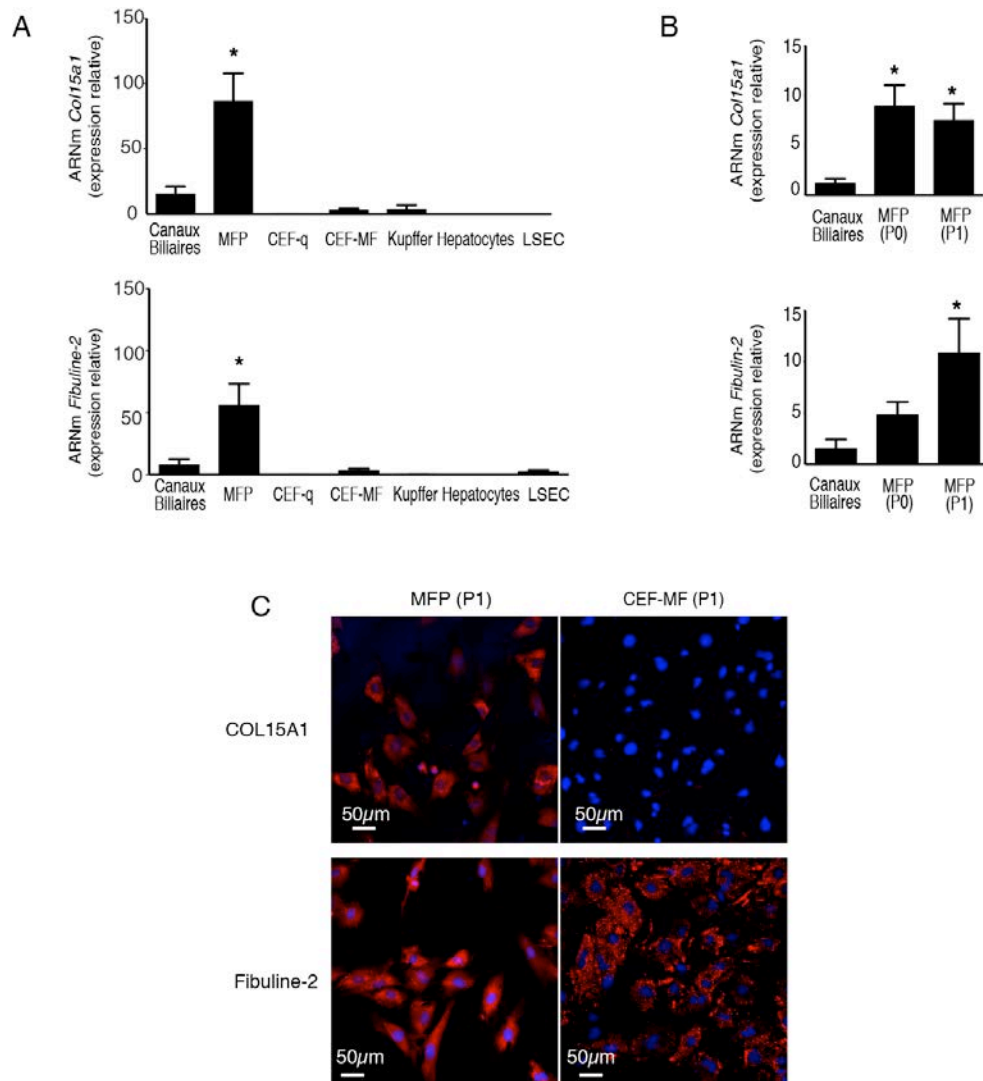


Figure 17 : Comparaison de Col15a1 à la fibuline-2 comme marqueur des MFP.

L'expression de COL15A1 et de la Fibuline-2 a été mesurée A) par RT-PCR dans les différents types cellulaires du foie de rat, incluant les canaux biliaires fraîchement isolés, les MFP à P1, les CEF quiescentes (CEF-q), les CEF-MF à P1, les cellules de Kupffer, les hépatocytes et les LSEC. Les résultats sont exprimés en niveau d'expression d'ARNm rapporté à celui retrouvé dans les CEF-MF et représentent les moyennes +/- SEM de 3 à 13 préparations cellulaires. * $p < 0,05$ par rapport aux autres types cellulaires ; B) par RT-PCR dans les canaux biliaires fraîchement isolés, dans les MFP à P0 et à P1. Les résultats sont exprimés en niveau d'expression d'ARNm rapporté à celui retrouvé dans les canaux biliaires et représentent les moyennes +/- SEM de 4 à 13 préparations cellulaires. * $p < 0,05$ par rapport aux canaux biliaires ; C) par immuno-fluorescence dans les MFP et les CEF-MF à P1.

L'ensemble de ces résultats valide donc Col15a1 comme marqueur spécifique des MFP. Il serait indépendant de l'activation myofibroblastique et marquerait vraisemblablement les précurseurs des MFP, présents dans les canaux biliaires juste après leur isolement.

III. Rôle des MFP dans l'angiogenèse hépatique *in vivo*

1) Matériel et Méthodes

Pour étudier l'implication des MFP dans l'angiogenèse qui accompagne la fibrose hépatique, nous avons suivi l'évolution de ces cellules dans le foie pathologique chez l'animal et chez l'homme. Nous avons utilisé 2 modèles animaux de fibrose chez le rat : un modèle de fibrose biliaire, la ligature de la voie biliaire principale ou *bile duct ligation* (BDL) et un modèle de fibrose non biliaire, l'intoxication par tétrachlorure de carbone (CCl₄). Ces 2 procédures conduisent à l'apparition progressive d'une fibrose extensive qui aboutit au développement d'une cirrhose en 6 semaines pour le modèle BDL et en 8 semaines pour le modèle CCl₄ (figure 18). Nous avons donc sacrifié les animaux à différents temps après le début de la procédure pour pouvoir étudier leur foie à différents degrés de fibrose.

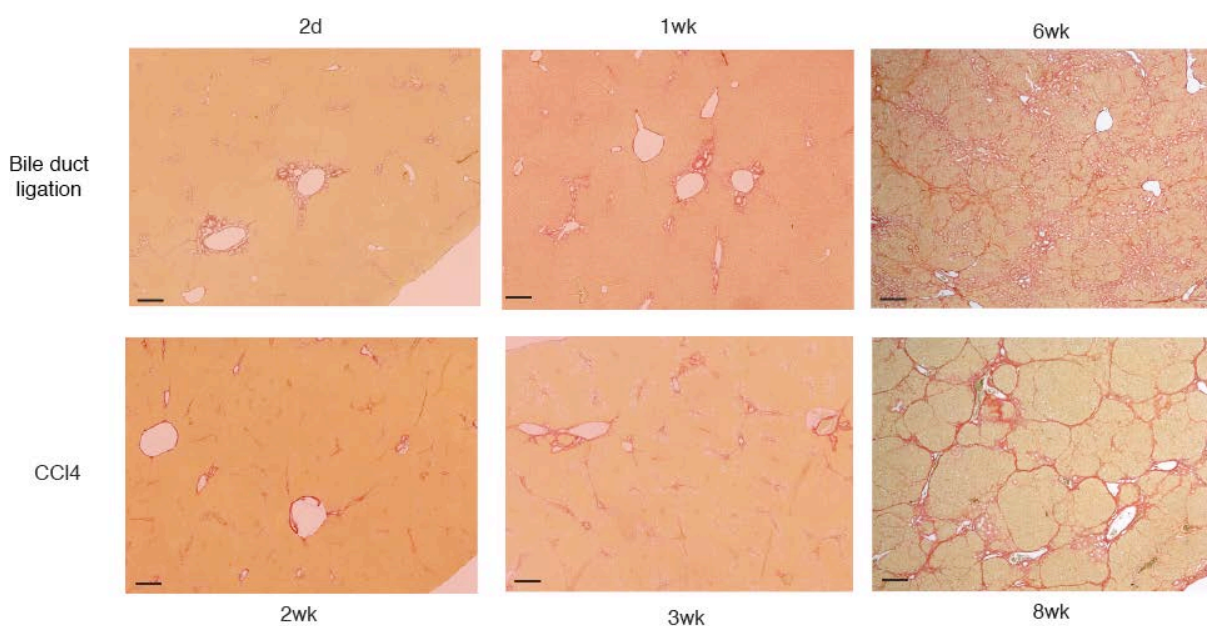


Figure 18: Modèles de fibrose hépatique chez le rat.

La fibrose hépatique a été évaluée par Rouge Sirius sur des coupes de foie de rat à 2 jours, 1 semaine ou 6 semaines après BDL et à 2, 3 ou 6 semaines après début d'administration de CCl₄. Photographies représentatives de 4-15 animaux à chaque temps, barre d'échelle : 500µm.

De façon complémentaire, nous avons étudié 2 pathologies hépatiques humaines : une pathologie biliaire, la cirrhose biliaire primitive (CBP) et une pathologie non biliaire, la

stéatopathie non alcoolique ou *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD). Ces 2 pathologies chroniques ont 2 étiologies bien différentes. La CBP est une affection auto-immune qui atteint surtout les femmes après 50 ans et dans laquelle une inflammation chronique des canaux biliaires intra-hépatiques entraîne une fibrose progressive jusqu'à la cirrhose. Cette pathologie est relativement rare puisque sa prévalence maximale est de 40 pour 100 000 habitants ¹⁴⁹. La NAFLD est quant à elle une affection beaucoup plus fréquente et dont l'incidence ne cesse d'augmenter dans les pays développés, faisant ainsi employer l'expression d' « épidémie » pour évoquer cette hépatopathie chronique. La NAFLD affecte les patients atteints d'un syndrome métabolique, défini par l'association d'au moins 3 critères parmi les 5 suivants: 1) obésité abdominale (tour de taille >102 cm pour les hommes, >88cm pour les femmes), 2) augmentation des triglycérides (>1,5g/l), 3) diminution du HDL cholestérol (<0,4g/l pour les hommes, <0,5g/l chez les femmes), 4) hypertension artérielle (pression artérielle systolique >130mmHg ou pression artérielle diastolique >85mmHg), 5) hyperglycémie (glycémie à jeun >1g/l)¹⁵⁰. La NAFLD comprend plusieurs types d'atteintes : la stéatose simple, définie par une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes et la NASH définie par une stéatose associée à des signes d'inflammation avec ou sans fibrose. Comme toutes les maladies chroniques du foie, la NAFLD peut évoluer vers la fibrose extensive et la cirrhose. Grâce à une collaboration avec les hépatologues cliniciens des 2 centres d'hépatologie des CHU de la Pitié-Salpêtrière et de Saint-Antoine, nous avons pu recueillir les biopsies de foie de 20 patients atteints de CBP et de 31 patients atteints NAFLD avec différents degrés de fibrose. Pour la CBP, le niveau de fibrose hépatique a été établi selon la classification METAVIR qui classe la fibrose de F0 (pas de fibrose) à F4 (cirrhose) (Tableau 1, page 18). Pour la NAFLD, les biopsies de foie ont été classées dans les catégories suivantes : stéatose simple sans fibrose, NASH sans fibrose avancée (F0 ou F1) ou NASH avec fibrose avancée (F2 ou plus), selon les recommandations récentes ¹⁵¹. Pour avoir des foies humains servant de contrôles auxquels comparer les foies pathologiques, nous avons également recueilli les biopsies hépatiques réalisées chez des sujets qui présentaient des anomalies des tests hépatiques et pour lesquels l'analyse histologique du foie s'est révélée normale (n= 9).

Pour suivre l'évolution des MFP, nous avons utilisé le nouveau marqueur que nous avons précédemment validé : le Col15a1. Dans les foies des animaux et des patients, nous avons mesuré par PCR quantitative l'expression du Col15a1 afin d'apprécier la quantité de MFP présents dans le foie. De la même façon, par PCR, nous avons mesuré l'expression du

facteur Von Willebrandt (vWF), marqueur de cellule endothéliale afin d'évaluer la quantité de cellules endothéliales et donc de vaisseaux sanguins présents dans le foie. Cette mesure était donc une appréciation de l'angiogenèse intra-hépatique. Les séquences des amorces utilisées pour la PCR apparaissent dans le tableau 9. Pour les analyses statistiques, nous avons utilisé le test de Student pour comparer les différents groupes et le test de Spearman pour calculer les coefficients de corrélation. Les résultats étaient considérés significatifs pour une valeur de $p < 0,05$.

De plus, nous avons étudié la distribution des MFP dans les foies cirrhotiques humains ainsi que leurs rapports par rapports aux cellules endothéliales, aux cholangiocytes. Pour cela, nous avons utilisé la méthode d'immuno-histochimie en marquant les foies fixés par les anticorps anti-COL15A1 (Sigma, HPA017913, 1/50), anti α -sma (Dako, 1A4, 1/100), anti-fibuline-2 (Sigma, HPA001934, 1/25) anti-CD31 (Dako, JC70A, 1/30) et anti CK19 (Dako, RCK108, 1/30) puis avec un anticorps secondaire conjugué à HRP pour Horseradish Peroxidase. Nous avons réalisé ces marquages sur des coupes sériées c'est à dire des coupes juxtaposées de la même région du foie et séparées les unes des autres seulement par l'épaisseur de la coupe (4 μ m). Pour compléter les premiers résultats obtenus, nous avons également effectué un marquage par immuno-fluorescence de ces mêmes prélèvements. Ainsi, en utilisant plusieurs anticorps secondaires couplés à des fluorochromes de couleur distinctes (Alexa fuor 488 or 568 (Invitrogen) 1/200), nous avons pu réaliser des doubles marquages (montrant donc l'expression de 2 marqueurs différents) sur une seule même coupe. Pour ces expériences, nous avons exploité 6 prélèvements d'hépatectomies provenant de foie cirrhotique et de 3 prélèvements foies normaux provenant des marges de résection de tumeurs hépatiques.

La spécificité de l'anticorps anti-COL15A1 a été testée en réalisant des expériences contrôles sur des cellules *in vitro* : contrôle positif montrant le marquage des cellules exprimant COL15A1 (MFP primaires de rat) et contrôle négatif montrant l'absence de marquage des cellules n'exprimant pas COL15A1 (*Normal Rat Cholangiocyte*, NRC, lignée cellulaire de cholangiocytes).

2) Expansion des MFP associée à l'angiogenèse aux stades de fibrose avancée

Dans le foie des rats, l'expression de l'ARNm Col15a1 augmentait progressivement après BDL ou CCl4 et cette augmentation devenait significative aux stades de cirrhose, correspondant respectivement aux temps de 8 et 6 semaines (figure 19). Le même résultat était retrouvé chez les patients atteints de CBP ou de NAFLD : en cas de fibrose absente ou modérée, l'expression de Col15a1 était similaire à celle retrouvée dans les foies des sujets contrôles, alors qu'en cas de fibrose avancée, l'expression de Col15a1 était significativement augmentée (figure 19). Cette augmentation de Col15a1 traduisait bien une augmentation du nombre des cellules et non pas leur activation, puisque nous avons montré, *in vitro*, que l'expression de Col15a1 était stable au cours de l'activation myofibroblastique des cellules entre P0 et P1 (figure 15). Ces résultats mettaient donc en évidence une expansion des MFP lors de la fibrogenèse à la fois dans les modèles animaux et chez l'homme mais également à la fois dans la fibrose d'origine biliaire et dans la fibrose d'origine non-biliaire. En effet, la littérature avait jusqu'à maintenant restreint l'implication des MFP à la fibrose de type biliaire.

Chez le rat comme chez l'homme, l'analyse des foies par PCR a montré une augmentation de l'expression du vWF parallèle à la progression de la fibrose, témoin d'une augmentation de la vascularisation hépatique et donc du résultat de l'angiogenèse (figure 19). Cette expression de vWF était corrélée significativement à celle de Col15a1. La corrélation était encore plus significativement marquée pour les pathologies non biliaires (CCl4 et NAFLD) que pour les pathologies biliaires (BDL et CBP).

Cette expansion parallèle des MFP et des cellules endothéliales au cours de la fibrogenèse suggérait une interaction entre ces 2 types cellulaires. C'est pourquoi nous avons poursuivi nos travaux en étudiant la distribution des MFP par rapport aux cellules endothéliales dans les foies cirrhotiques.

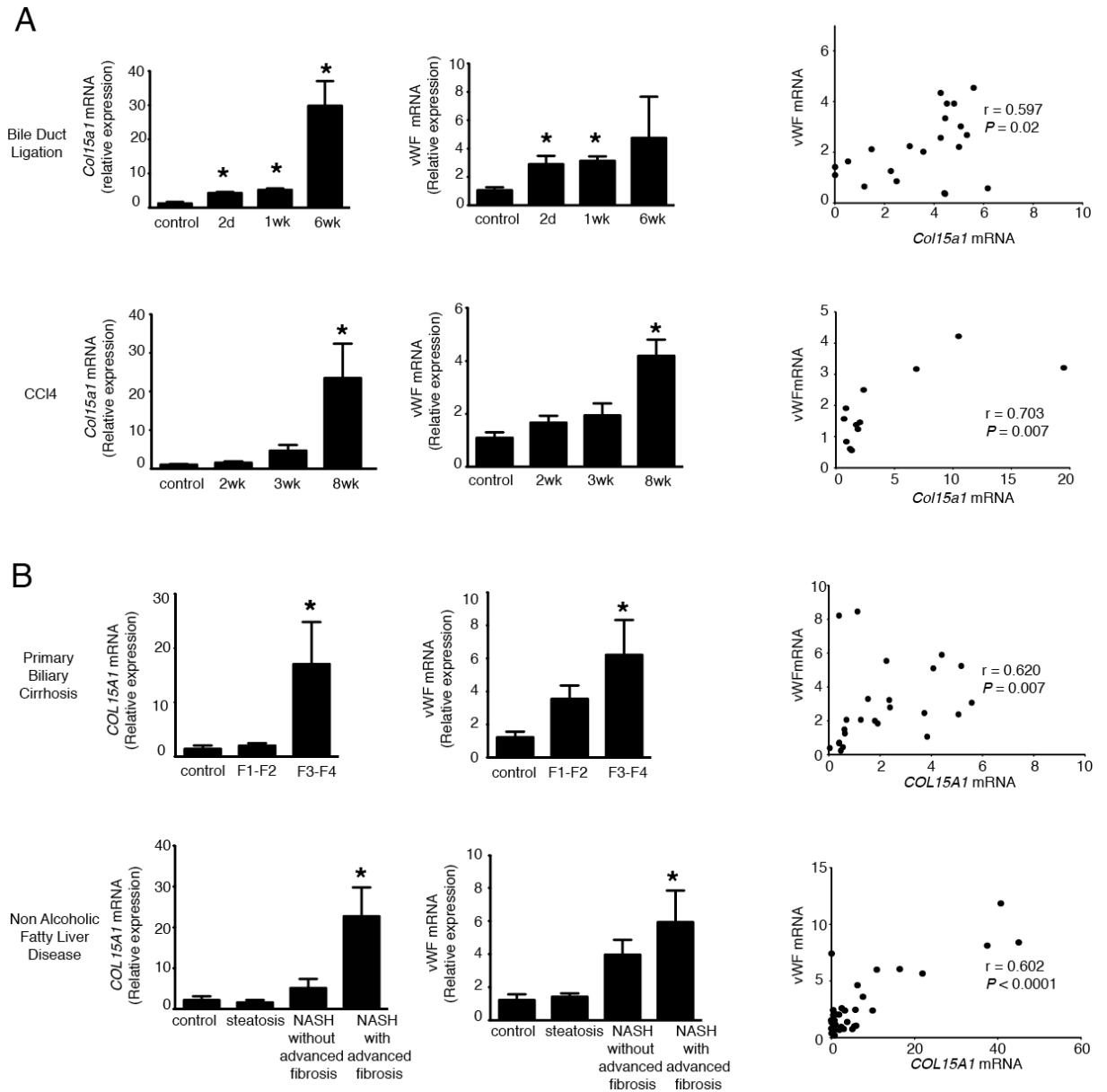


Figure 19: Les myofibroblastes portaux s'accumulent dans le foie aux stades de fibrose avancée, parallèlement à l'augmentation de l'angiogenèse.

A) Expression du collagène 15 et du facteur Von Willebrand par PCR quantitative dans les foies de rats après BDL ou intoxication par tétrachlorure de carbone. Résultats relatifs aux animaux contrôles exprimés en moyenne \pm SEM, * $p < 0,05$, $n = 4-15$ /groupe. B) Expression du collagène 15 et du facteur Von Willebrand par PCR quantitative dans les biopsies de foies de patients atteints de CBP ou NAFLD. Résultats relatifs à des sujets contrôles, exprimés en moyenne \pm SEM, * $p < 0,05$, $n = 8-12$ /groupe; BDL= bile duct ligation ;CCl4= tétrachlorure de carbone ; d= jour ; NASH= Non Alcoholic SteatoHepatitis ; PBC= Primary Biliary Cirrhosis ; SEM = standard error of the mean ; vWf= facteur vonWillebrand ; wk=semaine

3) Distribution péri-vasculaire des MFP dans le foie cirrhotique

L'anticorps anti-COL15A1 dont nous disposions ne permettait pas de marquer le tissu du rongeur, c'est pourquoi nos résultats des expériences d'immuno-marquage du foie seront limités au tissu humain.

L'analyse d'immuno-histochimie a révélé que le foie humain normal ne contenait que très peu de cellules positives pour COL15A1 (figure 20). Ces cellules étaient situées dans les espaces portes, autour des canaux biliaires (marqués par CK19) ou en zone péri-portale à proximité des canaux de Hering (marquées également par CK19). Sur certains prélèvements, ces cellules étaient disposées à proximité du plexus vasculaire péri-biliaire, vaisseau nourricier du canal biliaire, marqué par CD31. De plus, ces cellules étaient négatives pour α -sma montrant ainsi qu'elles n'étaient pas des myofibroblastes et qu'elles étaient distinctes des cellules musculaires lisses, présentes autour des vaisseaux. L'analyse en immuno-fluorescence du foie normal à fort grossissement permettait de montrer avec certitude que l'anticorps anti-COL15A1 marquait bien des cellules, identifiées par la présence d'un noyau marqué par le Draq5 et non pas de la matrice extra-cellulaire ou la membrane basale des cholangiocytes (figure 21).

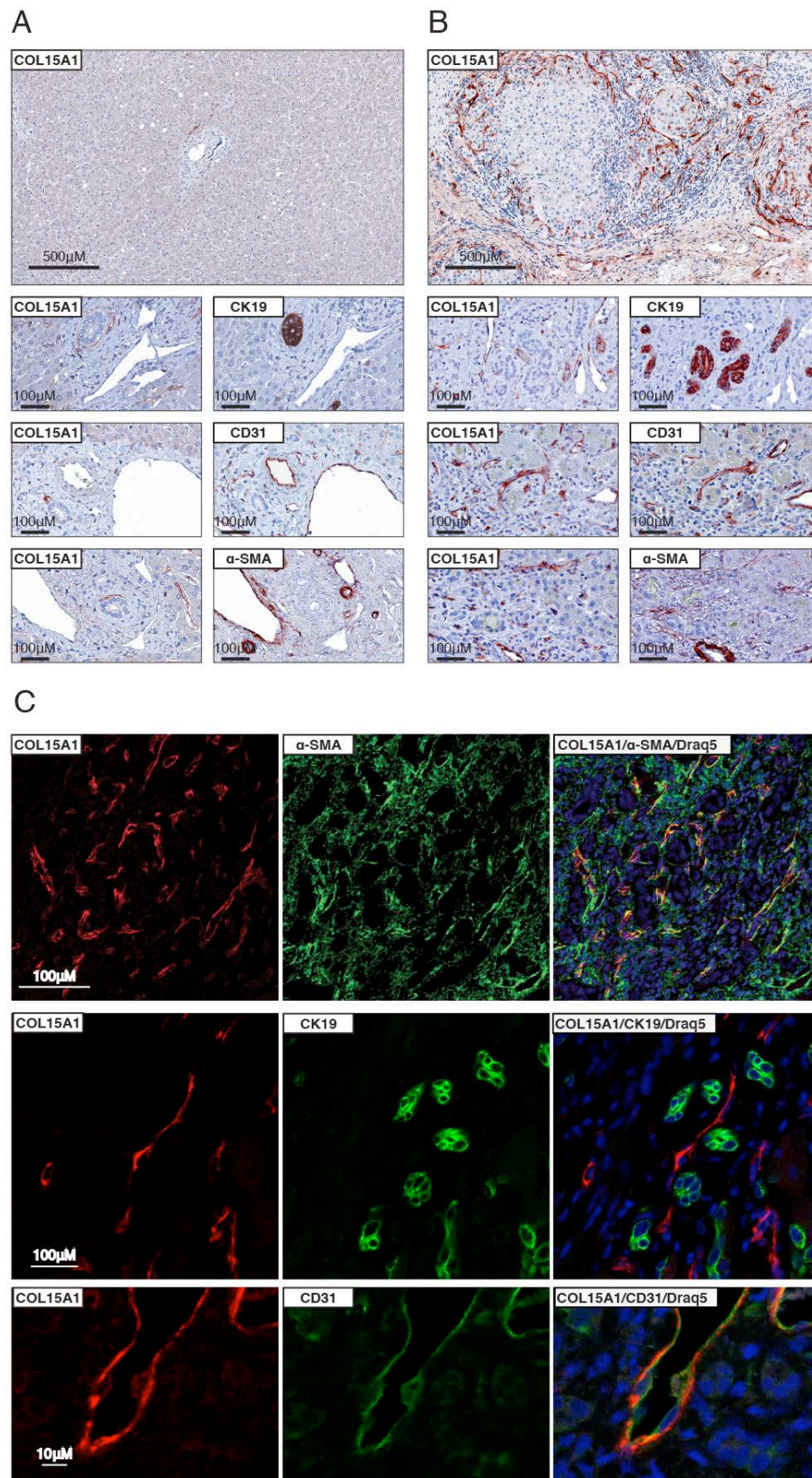


Figure 20 : Distribution du marquage COL15A1 dans le foie humain sain et cirrhotique.

Légende ci-après

A,B) Coupes séries de foie humain normal et cirrhotique marquées pour COL15A1, CK19, CD31 et α -SMA. A) Dans le foie normal, les rares cellules positives pour COL15A1 (panel supérieur), montrées par les flèches et les têtes de flèches, étaient situées dans les espaces portes, à côté des canaux biliaires et des canaux de Hering (désignés par les flèches et les têtes de flèches, respectivement), positifs pour CK19, et autour du plexus vasculaire biliaire, positif pour CD31. Ces cellules étaient distinctes des cellules musculaires lisses, positives pour α -SMA. B) Dans le foie cirrhotique, les cellules positives pour COL15A1 étaient nettement plus nombreuses (panel supérieur); elles étaient également positives pour α -SMA, principalement autour des vaisseaux marqués par l'anticorps anti-CD31 dans les larges septa fibreux. Elles étaient localisées à proximité des cellules biliaires positives pour CK19. C) L'immuno-fluorescence réalisée sur le foie humain cirrhotique a montré que les cellules positives pour COL15A1 exprimaient aussi aussi α -SMA (panel supérieur) même si la surface du marquage α -SMA dépassait largement celle du marquage COL15A1. Les cellules positives pour COL15A1 étaient situées à proximité des canaux en prolifération, positifs pour CK19 (panel central) et enroulées autour des cellules endothéliales positives pour CD31 (panel inférieur). Les photographies présentées correspondent aux images en projection et l'encadré montre un zoom sur une coupe z-stack.

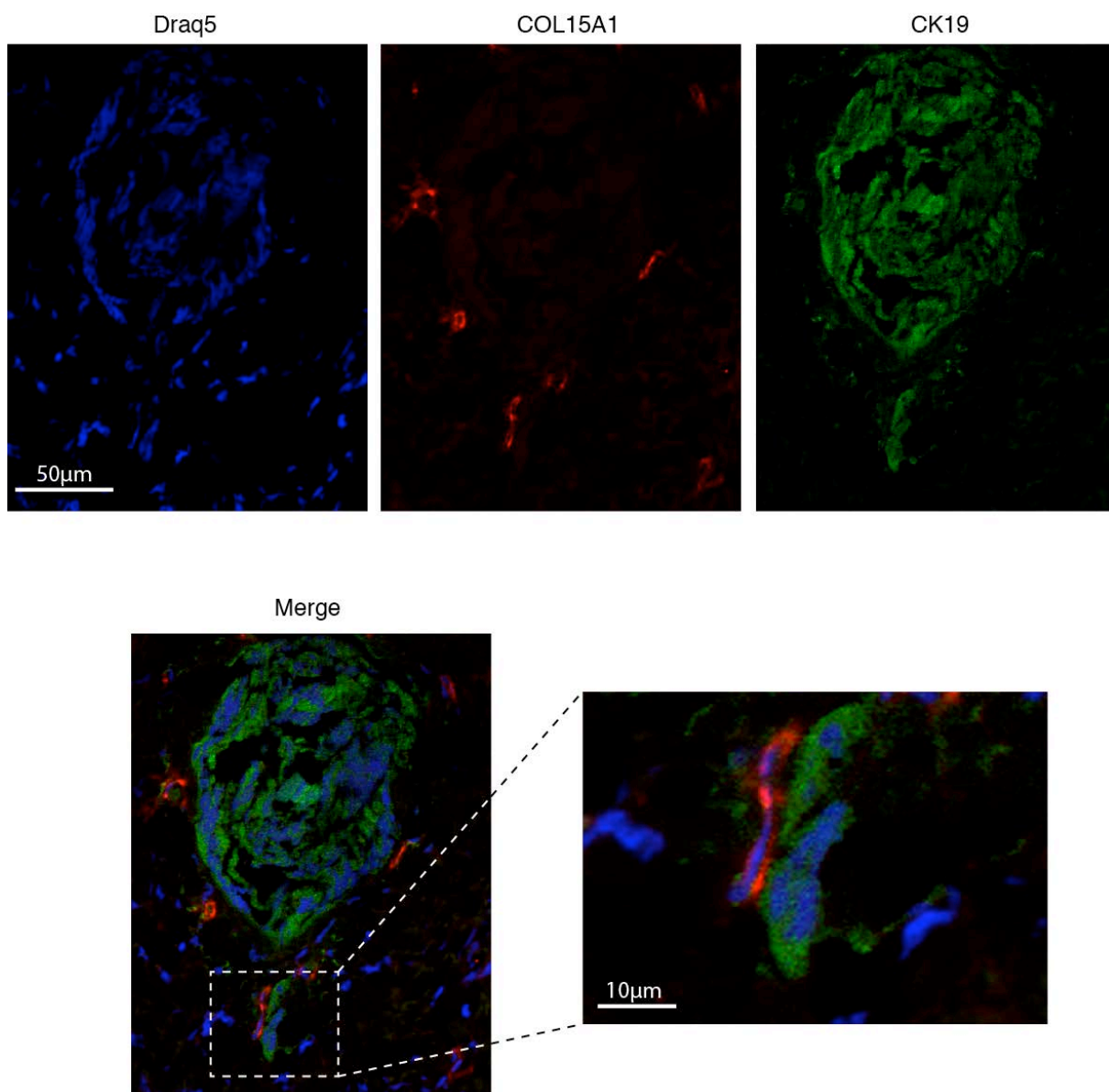


Figure 21 : Localisation de cellules positives pour COL15A1 à proximité des cholangiocytes dans le foie normal.

Des coupes de foie humain normal ont été marquées en immuno-fluorescence avec des anticorps anti-COL15A1 et anti-CK19, montrant des cellules positives pour COL15A1 autour d'un canal biliaire et adjacentes au canal de Hering (zoom encadré).

Dans le foie cirrhotique, les cellules positives pour COL15A1 étaient beaucoup plus nombreuses (figure 20). Cette observation corroborait donc avec les résultats de la PCR qui montrait une augmentation majeure de l'expression de COL15A1 au stade de cirrhose. L'examen des coupes de foie montrait que les cellules positives pour COL15A1 étaient localisées dans les septa fibreux et étaient également positives pour α -sma (figure 20), correspondant donc à des myofibroblastes et plus précisément aux MFP. Néanmoins, la

surface de marquage α -sma excédait largement celle du marquage COL15A1, montrant donc que la majorité des myofibroblastes hépatiques n'était pas constituée par les MFP et provenaient très probablement de l'activation des CEF. Ainsi, ce résultat était en accord avec les études récentes ayant montré la contribution majeure des CEF à la fibrose hépatique^{5, 36}.

Lors du processus de fibrogenèse, les canaux biliaires prolifèrent réalisant ainsi ce que l'on appelle la réaction ductulaire. Le marquage des coupes de foie par CK19 permettait aisément de mettre en évidence ces canaux biliaires en prolifération et de montrer que les MFP étaient situés à proximité de ces derniers (figure 20).

De plus, le marquage par l'anticorps anti-COL15A1 montrait que les MFP étaient co-localisés avec les cellules endothéliales, marquées par le CD31, des vaisseaux présents dans les septa fibreux (figure 20). L'examen de ces zones à plus fort grossissement montrait que les MFP et les cellules endothéliales étaient étroitement enroulés autour des lumières vasculaires. Pour vérifier que nous ne marquions pas les cellules endothéliales avec l'anticorps anti-COL15A1, nous avons isolé les cellules endothéliales du foie humain selon un protocole déjà validé qui permet d'obtenir une fraction de cellules non parenchymateuses du foie, enrichie en cellules endothéliales et en cellules de Kupffer²⁴. Nous avons analysé cette fraction de cellules par cytométrie en flux après les avoir marquées avec les anticorps anti-CD31 et anti-COL15A1 (figure 22). Parmi toutes les cellules analysées en cytométrie en flux, 27% étaient positives pour CD31, correspondant donc à des cellules endothéliales. Parmi ces cellules endothéliales, 0% exprimaient le COL15A1. Cette expérience montrait donc qu'il existait bien 2 types cellulaires distincts localisés autour des lumières vasculaires dans les septa fibreux : les cellules endothéliales positives pour CD31 et les MFP positifs pour le COL15A1.

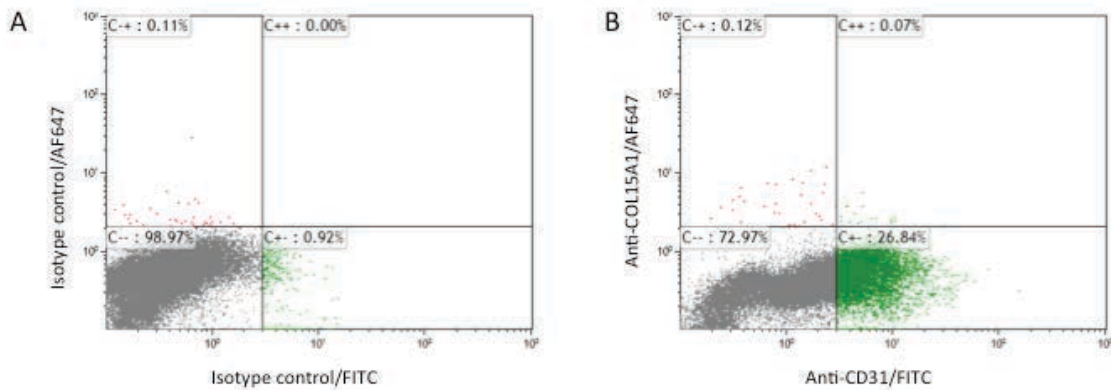


Figure 22 : Analyse par cytométrie en flux d'une fraction de cellules non-parenchymateuses du foie humain, enrichie en cellules endothéliales et en cellules de Kupffer.

Une fraction de cellules non parenchymateuses, enrichie en cellules endothéliales et en cellules de Kupffer a été obtenue par centrifugation des cellules de foie humain normal sur double gradient de Percoll, comme précédemment publié²⁴. Les cellules ont été fixées par paraformaldéhyde puis incubées avec un anticorps monoclonal anti-CD31 humain couplé au fluorochrome FITC (MHCD3101, Invitrogen; 1/50) pendant une heure puis avec l'anticorps anti-COL15A1 humain de lapin (Sigma, 1/20) dans du PBS 1X avec saponine 2% et albumine 1% pendant la nuit. Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé au fluorochrome AlexaFluor 647 (Invitrogen; 1/100) pendant une heure (B). Les anticorps isotypiques contrôles couplés FITC et AlexaFluor 647 ont été utilisés comme contrôles pour mesurer la fluorescence basale, non spécifique (A). Les cellules ont été analysées par un cytomètre BD LSR II (BD Biosciences), en utilisant le logiciel Kaluza (Beckman Coulter). Les résultats montrent l'absence de cellule positive pour COL15A1 dans cette fraction, en particulier parmi les cellules positives pour CD31.

Nous avons également marqué les coupes de foie humain par l'anticorps anti-Fibuline-2 afin de comparer la distribution *in vivo* de ce marqueur à celle de notre nouveau marqueur des MFP, le COL15A1. Sur les coupes de foie cirrhotique, le marquage par la Fibuline-2 était co-localisé avec celui du COL15A1, adoptant une disposition péri-vasculaire (figure 23), en accord avec les résultats d'études antérieures sur la Fibuline-2¹⁵². Cependant, la surface de marquage par la Fibuline-2 excédait largement celle du marquage par COL15A1 (figure 23). Cette différence pouvait s'expliquer par la spécificité moindre de la Fibuline-2. En effet, précédemment, nous avons montré que la Fibuline-2 était également exprimée dans les CEF-MF (figure 17). De plus, cette protéine pourrait être excrétée de façon plus abondante que le COL15A1 dans la matrice extra-cellulaire. Une autre hypothèse serait que le COL15A1 ne serait pas exprimé de la même façon dans tous les MFP (figures 16 et 17) ou bien serait restreint à une certaine sous-population de MFP, sous-population impliquée dans l'angiogenèse.

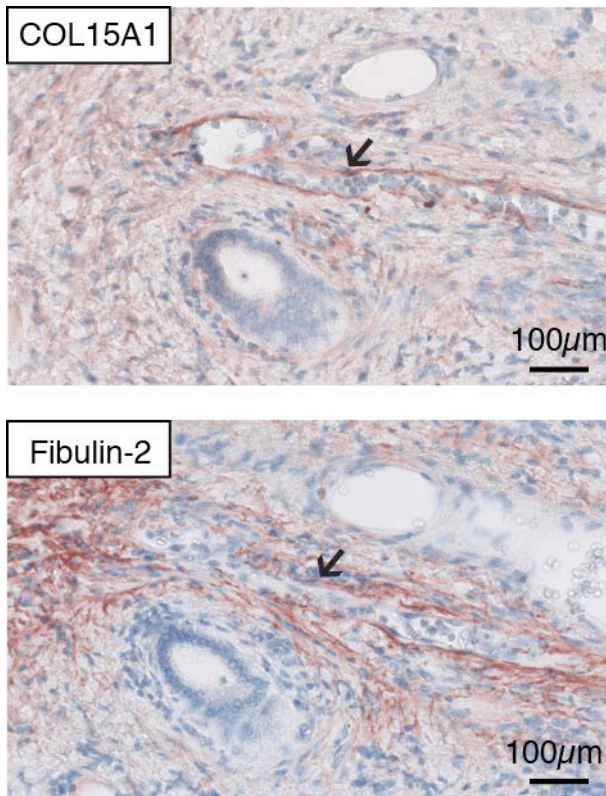


Figure 23 : Marquage du foie cirrhotique humain par COL15A1 et Fibuline-2.

L'expression de COL15A1 et de Fibuline-2 a été étudiée par immuno-histochimie sur des coupes sériées de foie cirrhotique humain, montrant la même localisation autour des vaisseaux capillaires dans les larges septa fibreux (flèche), même si la surface marquée par la Fibuline-2 était nettement supérieure à celle marquée par COL15A1.

La disposition péri-vasculaire des MFP dans le foie humain cirrhotique était donc en faveur d'un rôle pro-angiogénique pour ces cellules. La suite de notre travail a consisté à démontrer les fonctions pro-angiogéniques des MFP en utilisant notre modèle cellulaire caractérisé précédemment et à étudier les mécanismes impliqués dans ces fonctions.

IV. Propriétés angiogéniques des MFP *in vitro*

1) Matériel et méthodes

a) Matériel

Pour étudier les fonctions pro-angiogéniques des MFP, nous avons donc utilisé le modèle de cellule primaire de MFP de rat, que nous avons caractérisé précédemment (paragraphe I). Nous avons utilisé ces cellules après premier passage, à P1, quand elles étaient pleinement activées en myofibroblastes. Pour les tests d'angiogenèse, nous avons utilisé soit les cellules elles-mêmes soit leur milieu conditionné, correspondant au surnageant de culture, recueilli 24 heures après que les cellules aient été placées avec du milieu dépourvu de SVF. Les milieux conditionnés étaient conservés à -80°C.

Pour les tests d'angiogenèse, nous avons utilisé plusieurs types de cellules endothéliales :

- **TSEC** (*Transformed Sinusoidal Endothelial Cells*): lignée murine de cellules endothéliales sinusoidales du foie¹⁵³
- **LSEC** (*Liver Sinusoidal Endothelial Cells*): cellules endothéliales sinusoidales primaires isolées à partir du foie de rat selon une méthode déjà validée utilisant un double gradient de Percoll permettant d'isoler une fraction enrichie en cellules endothéliales et en cellules de Kupffer et l'adhésion sélective permettant de séparer les cellules endothéliales des cellules de Kupffer²⁴. La pureté de la culture des LSEC était mesurée par immunomarquage CD31 and VEGFR-2 qui montrait 90% de cellules positives pour ces 2 marqueurs de cellules endothéliales (figure 24).

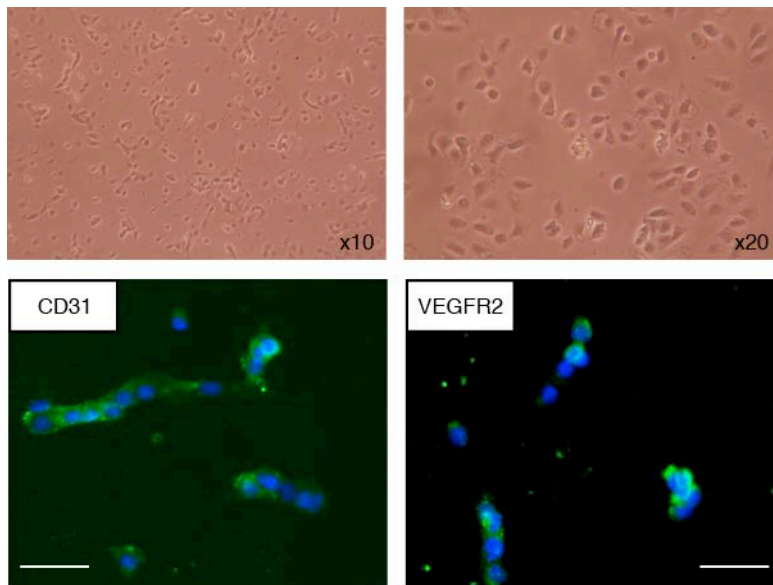


Figure 24 : Caractérisation des LSEC primaires de rat.

Photographies des cellules observées au microscope à contraste de phase (panel supérieur) et au microscope à fluorescence (panel inférieur) le lendemain de leur isolement à partir du foie de rat sain. L'expression de CD31 et de VEGFR-2 a été analysée par immuno-fluorescence (panel inférieur). Barre d'échelle= 50µm.

Les TSEC et les HUVEC ont été cultivées dans du DMEM contenant 100UI-100mg/mL de pénicilline-streptomycine, 5% de SVF et 1% d'*Endothelial Cell Growth Supplement* (ECGS, ScienCell).

- **HUVEC** (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) : lignée humaine de cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical, donc non hépatique. Les HUVEC ont été cultivées dans du milieu *Endothelial Cell Basal Medium* (Promocell GmbH) contenant 100UI-100mg/mL de pénicilline-streptomycine, 2% de SVF et 1% de *Endothelial Cell Growth Medium Supplement Mix* (Promocell GmbH).

Pour étudier l'effet des cholangiocytes, nous avons utilisé le modèle de *Normal Rat Cholangiocyte* (NRC), une lignée de cholangiocyte de rat, cultivée sur des flasques recouvertes par du collagène I (Becton Dickinson) dans du milieu DMEM-F12 contenant 5% de SVF ainsi que tous les additifs supplémentaires nécessaires à leur culture, selon la méthode précédemment publiée¹⁵⁴.

Pour étudier l'effet des hépatocytes, nous avons isolé des hépatocytes primaires de rat selon une méthode préalablement validée¹⁵⁵ et nous les avons cultivés sur des flasques

recouvertes de collagène I dans du milieu William's Glutamax (Gibco, Life Technologies) préparé avec 100UI-100mg/mL de pénicilline-streptomycine, 10 % de SVF, 20% d'albumine et 0,1IU/ml d'insuline.

b) Méthodes

Pour évaluer les capacités angiogéniques des MFP, nous avons réalisé plusieurs tests d'angiogenèse :

-Test de migration : test de chémo-attraction en chambre de Boyden modifiée. Nous avons utilisé des inserts équipés d'une membrane avec des pores de 8µm (Corning Incorporated) placés dans des plaques de 12 puits. Le milieu conditionné des MFP ou le milieu DMEM basal, utilisé comme contrôle, était ajouté dans le compartiment inférieur du puits. Les cellules endothéliales étaientensemencées dans le compartiment supérieur du puits, à la densité 150 000 cellules/cm² et incubées pendant 6 heures dans un milieu sans SVF. A la fin de l'incubation, les cellules ayant migré à travers le filtre étaient fixées par paraformaldehyde 4% et colorées avec le DAPI (Sigma-Aldrich), pour être ensuite quantifiées dans 6 champs aléatoires capturés à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Leica), à un grossissement x10 .

-Test de tubulogenèse : Les cellules endothéliales, après avoir été placées dans un milieu sans SVF depuis la veille au soir, étaientensemencées à la densité de 30 000 cellules/cm² dans des puits LAB-TEK (Thermofischer Scientific) préalablement recouverts par 70 µL de Matrigel *growth factor-reduced* (BD Biosciences), et incubées pendant 6 heures en présence du milieu conditionné des MFP ou du milieu basal contrôle. Pour les expériences de co-culture, les TSEC et les MFP ont été d'abord marqués par incubation avec les traceurs fluorescents Invitrogen fluorescent cell tracker CMPTX (rouge) and CMFDA (vert), respectivement. En co-culture, les TSEC ont étéensemencées seules ou avec les PMF à la densité totale de 25 000 cellules/cm² en présence d'un milieu dépourvu de SVF. Après incubation pendant 6 heures, la formation de tubes était appréciée par un microscope à contraste de phase ou un microscope spinning disk (Leica). La tubulogenèse était quantifiée par la longueur totale des tubes et la largeur des tubes (figure 25), mesurée dans 10 champs

aléatoires au grossissement x4 ou x10, à l'aide du logiciel Fiji (General Public License). Pour la vidéo-microscopie, un test de tubulogénèse de 24 heures a été filmé par une caméra associée à un microscope dans un incubateur (Biostation, Nikon), au grossissement x20.

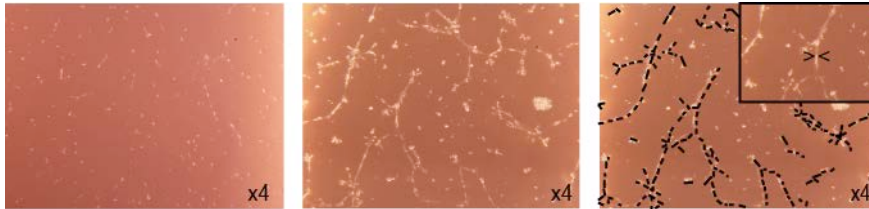


Figure 25: Méthode de quantification du test de tubulogénèse.

6 heures après leur ensemencement sur Matrigel, les cellules endothéliales étaient observées au microscope et 10 photographies étaient acquises dans des champs aléatoires des puits. La tubulogénèse était quantifiée en mesurant sur chaque photographie la longueur des tubes (-----) et la largeur des tubes (><)

- **Microscopie électronique.** Les cellules ont été fixées par glutaraldéhyde 2% dilué dans un tampon de sodium cacodylate 0.1 mol/L (pH 7.4) pendant 1h à 4°C et post-fixées dans du tetroxide d'osmium 1% préparé dans le même tampon. Les échantillons ont ensuite été deshydratés et inclus dans des résines Epoxy. Des coupes semi-fines (0.5 μm) et ultra-fines (90 nm) ont été réalisées avec un ultramicrotome UC7. Les coupes semi-fines, colorées avec du bleu de toluidine 1% ont été utilisées pour sélectionner la région d'intérêt. Les coupes ultra-fines ont été colorées avec de l'acétate d'uranyl dilué dans de l'éthanol 50% et du Lead Citrate (Reynold's formula) pendant 5 minutes puis examinées avec un microscope électronique Philips CM120, fonctionnant à 120 kV. Les images (4008x2672 pixels; pixel size: 9 μm x 9 μm) ont été acquises avec un appareil piloté par le logiciel iTEM software (Olympus). La préparation des échantillons et l'acquisition des images en microscopie électronique s'est faite avec Dominique Langui, sur la plate forme d'imagerie cellulaire de la Pitié-Salpêtrière (INSERM UMRS 975/CNRS UMR 7225/UPMC). L'interprétation des images de microscopie électronique s'est faite avec Gérard Feldmann (Université Paris 7-Denis Diderot & INSERM, UMRS 773)

- **Test de l'implant de Matrigel.** Les implants de Matrigel ont été préparés en mélangeant 400 μl de Matrigel *growth factor-reduced* avec 10 μl d'héparine (5 IU) et 100 μl de milieu: soit du milieu conditionné des MFP, soit du milieu basal DMEM contrôle. Ils ont été ensuite injectés en sous-cutané chez des souris sauvages de la lignée C57BL/6J ou chez

des souris immuno-déficientes par absence de thymus de la lignée Rj:NMRI-*Foxn1tm/Foxn1tm* appelées “souris nude”(Janvier Labs). Tous les animaux ont reçu une injection des 2 préparations, une dans chaque flanc. Sept jours après l’injection, l’animal était sacrifié et les implants étaient retirés pour analyse macroscopique et mesure de la concentration en hémoglobine par le test de Drabkin (Sigma-Aldrich).

Analyse des microparticules

L’analyse des microparticules (MP) s’est faite en collaboration avec Pierre-Emmanuel Rautou (hépatologue clinicien et chercheur) et Jean-Marie Renard (ingénieur) dans l’équipe INSERM de Chantal Boulanger au Centre de Recherche Cardio-vasculaire de Paris (PARCC) de l’hôpital Européen Georges Pompidou. Les MP libérées dans le milieu conditionné des MFP ont été analysées par cytométrie en flux, en utilisant le cytomètre Guava easyCyte 8HT (Millipore) ¹⁵⁶. Les régions correspondant aux MP étaient identifiées sur un graphique logarithmique représentant l’intensité de la dispersion du faisceau lumineux et l’angle de déviation de ce faisceau par sa rencontre avec les MP. La fenêtre des MP était définie en utilisant des microbilles de calibrage (de diamètre de 0,1, 1, 4 et 10µm; Invitrogen), comme des événements de 0,1 à 1 µm de diamètre et marquées par l’annexine V, conjuguée à l’allophycocyanine (Becton Dickinson) diluée dans un tampon composé de NaCl 140 mmol/L, HEPES 10 mmol/L (pH 7.4) en présence ou absence, pour la condition contrôle, de CaCl₂ (5 mmol/L). Une concentration connue de microbilles de calibrage Flowcount (20 µL; Beckman Coulter) était ajoutée à chaque échantillon juste avant l’analyse par cytométrie en flux. Les concentrations de MP étaient ainsi déterminées par comparaison avec celle des microbilles de calibration. Pour l’extraction des MP, le milieu conditionné était d’abord centrifugé à 500g pendant 15 minutes à température ambiante afin de faire sédimenter les débris cellulaires et les corps apoptotiques. Le surnageant de cette première centrifugation était ensuite soumis à une deuxième centrifugation de 20 500g pendant 2h30 à 4°C afin de faire sédimenter les MP. Enfin, le surnageant de cette 2eme centrifugation était filtré sur des filtres avec des pores de 0,1 µm pour s’assurer de l’exclusion totale de MP. Les MP obtenues par différentes préparations de MFP ont été mélangées pour être re-suspendues dans du DMEM et leur effet a été directement testé sur les cellules endothéliales lors du test de tubulogénèse. Les TSEC, placées depuis la veille au soir, dans un milieu dépourvu de SVF, ont été incubées avec les MP préalablement marquées par un traceur fluorescent (Invitrogen), ou avec les surnageants de centrifugations des MP comme contrôles. Après 24 heures

d'incubation, les cellules ont été lavées avec du PBS, fixées avec du paraformaldehyde 4%, et marquées avec un anticorps anti-CD31 (Abcam, ab28364-100, 1/50) et du DraQ5, 1/1000, puis examinées avec un microscope confocal SP2 (Leica).

PCR

Pour la PCR, nous avons appliqué la même méthode que celle précédemment décrite (paragraphe I. 2)).

Analyses concernant la signalisation du VEGF.

Les concentrations de VEGF-A dans le milieu conditionné des MFP ont été déterminées en utilisant le kit ELISA DuoSet pour VEGF-A de rat (R&D Systems). VEGFR-2 et phospho-VEGFR-2 (Tyr1175) ont été analysés par Western Blot. Pour inhiber VEGF-A, les MFP ont été transfectés en utilisant la Lipofectamine RNAimax soit avec un SiRNA dirigé contre VEGF-A soit avec un SiRNA aspécifique (Life Technologies).

Statistiques.

Pour les comparaisons, nous avons utilisé le Test de Student. De façon conventionnelle, les résultats étaient jugés significatifs pour une valeur de $p < 0.05$.

2) Démonstration du pouvoir pro-angiogénique des MFP

a) Effet de la co-culture des MFP sur la tubulogenèse endothéliale

La co-culture des MFP avec les TSEC entraînait une tubulogenèse supérieure à celle obtenue par la monoculture des cellules endothéliales (figure 26). En effet, la longueur et la largeur des tubes étaient augmentées en co-culture par rapport à la mono-culture. La réalisation de cette expérience avec différents ratios de MFP et de TSEC a permis de montrer qu'il existait un effet dose-dépendant. En effet, plus la proportion de MFP était importante dans la co-culture et plus la tubulogenèse était augmentée.

Le marquage des TSEC et des MFP par des traceurs fluorescents rouge et vert, respectivement, a révélé que les 2 types de cellules interagissaient en s'enroulant les unes

autour des autres pour collaborer à la formation d'un réseau tubulaire complexe. Ces interactions étaient encore plus nettement visibles sur la video-microscopie du test de tubulogenèse. L'examen de la co-culture en microscopie électronique a permis de montrer que les MFP étaient capables d'établir des jonctions inter-cellulaires avec les cellules endothéliales. Ces jonctions étaient de 2 types différents : les jonctions *Gap* et les desmosomes. Les jonctions *Gap* sont visualisées comme le rapprochement ponctuel des membranes plasmiques de 2 cellules adjacentes, apparaissant comme un espace inter-cellulaire rétréci. Ce type de jonction a été montré impliqué dans la maturation vasculaire⁷⁴. Les desmosomes apparaissent sous la forme typique de 2 héli-plaques denses à la face cytoplasmique de la membrane de chaque cellule. Ces jonctions fournissent la stabilité mécanique par leur ancrage aux filaments intermédiaires du cytosquelette.

Donc, de par leur présence physique, les MFP favorisent la tubulogenèse des cellules endothéliales. De plus, la capacité des MFP à établir des jonctions inter-cellulaires avec les cellules endothéliales va permettre de favoriser l'une des étapes clés de l'angiogenèse : la stabilisation des vaisseaux néo-formés.

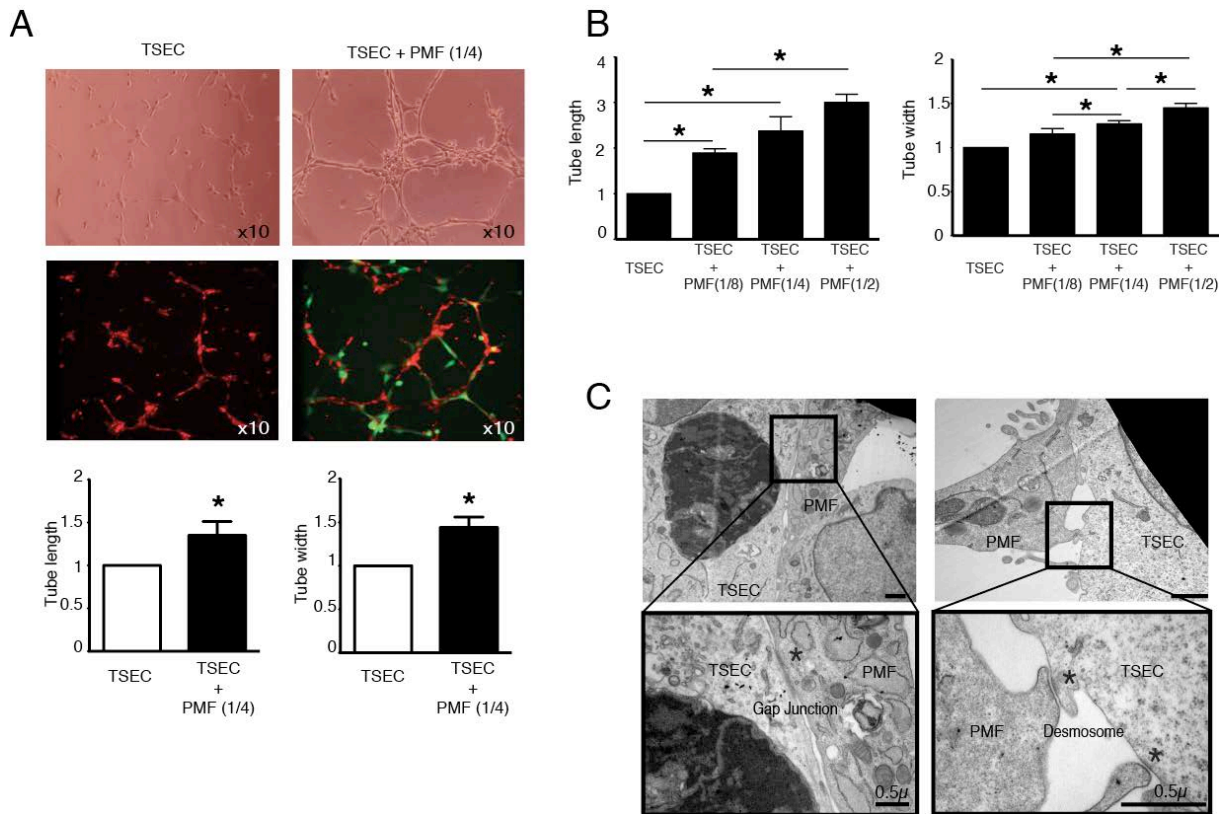


Figure 26 : Effet de la co-culture des MFP sur la tubulogénèse endothéliale.

L'angiogénèse a été analysée par le test de tubulogénèse réalisé avec la co-culture de TSEC et de MFP. La monoculture des TSEC a servi de contrôle, et dans chaque condition la quantité totale de cellules utilisée était identique. A) Les tubes ont été examinés avec un microscope à contraste de phase pour déterminer leurs mesures ou avec un *spinning disk* pour la visualisation des TSEC et des MFP (PMF), marqués par un traceur fluorescent rouge ou vert, respectivement (n=5). B) Effet dose-dépendant sur la tubulogénèse de la proportion de MFP dans la co-culture avec les TSEC (n=3). C) Les tubes obtenus avec $\frac{1}{4}$ de MFP et $\frac{3}{4}$ de TSEC ont été examinés en microscopie électronique montrant la formation de jonctions *gap* (à gauche) et de desmosomes (à droite) entre les MFP et les TSEC, barre d'échelle sans légende=1 μm. La quantification de la tubulogénèse a été faite sur des photographies au grossissement x10. Les résultats sont exprimés en ratios par rapport à la valeur de la condition contrôle, fixée arbitrairement à 1 et représentent les moyennes +/- SEM . * p<0,05.

b) Effet du milieu conditionné des MFP sur l'angiogénèse in vitro

Nous avons testé les capacités pro-angiogéniques des MFP en utilisant leur milieu conditionné dans les tests de migration et de tubulogénèse des cellules endothéliales.

La capacité de migration des TSEC était significativement augmentée en présence du milieu conditionné des MFP. En effet, le nombre de cellules endothéliales ayant migré au travers du filtre sous l'effet du milieu conditionné des MFP était multiplié par 5 par rapport à la condition contrôle (figure 27). De la même façon, la migration des HUVEC était significativement augmentée en présence du milieu conditionné des MFP (figure 27). Ainsi,

les MFP étaient capables de recruter les cellules endothéliales, de type sinusoidal et non sinusoidal, à distance pour former de nouveaux vaisseaux.

De façon réciproque, nous avons testé les capacités de migration des MFP en présence de milieu basal contrôle ou du milieu conditionné des TSEC. Ces expériences ont montré que la migration des MFP était augmentée sous l'effet du milieu conditionné des cellules endothéliales. Ainsi donc, les MFP pouvaient à la fois attirer les cellules endothéliales et également migrer vers elles.

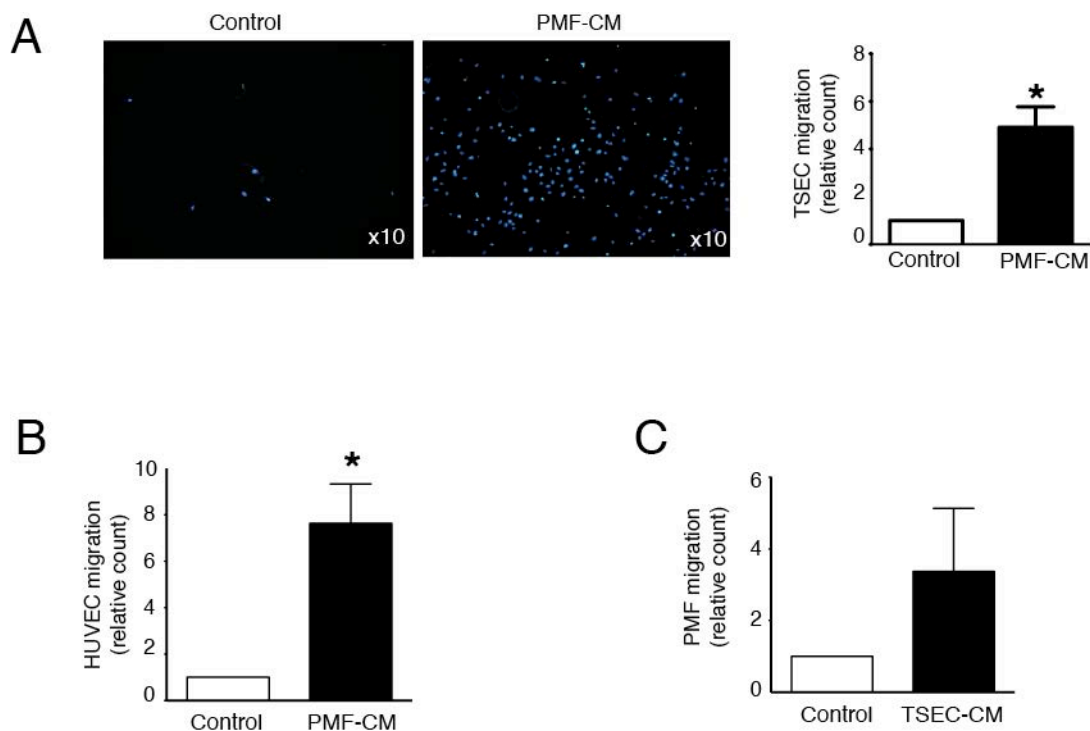


Figure 27 : Effet des MFP sur la migration des cellules endothéliales.

A, B) Effet du milieu conditionné (CM) des MFP (PMF) sur la migration des cellules endothéliales, lors du test de chémo-attraction au travers d'un filtre. Les cellules qui ont migré à travers le filtre en présence du milieu contrôle ou du milieu conditionné des MFP (PMF-CM) ont été colorées par le DAPI pour pouvoir être comptabilisées avec un microscopie à épifluorescence. A) Migration des TSEC, n=15. B) Migration des HUVEC, n=5. C) Migration des MFP en présence du milieu contrôle ou du milieu conditionné des TSEC, n=3.

Nous avons ensuite réalisé le test de tubulogenèse sur Matrigel. La tubulogenèse des TSEC était augmentée sous l'effet du milieu conditionné des MFP (figure 28). En effet, en présence de ce milieu, les tubes formés par les TSEC avaient une longueur et une largeur supérieures aux tubes formés par ces mêmes cellules incubées avec le milieu contrôle. Le même résultat de stimulation de la tubulogenèse par le milieu conditionné des MFP était

retrouvé avec les autres types de cellules endothéliales, à savoir les HUVEC et les LSEC (figure 28).

Ces deux expériences montraient donc que les MFP sécrétaient des facteurs capables de stimuler la migration et la tubulogenèse des cellules endothéliales *in vitro*.

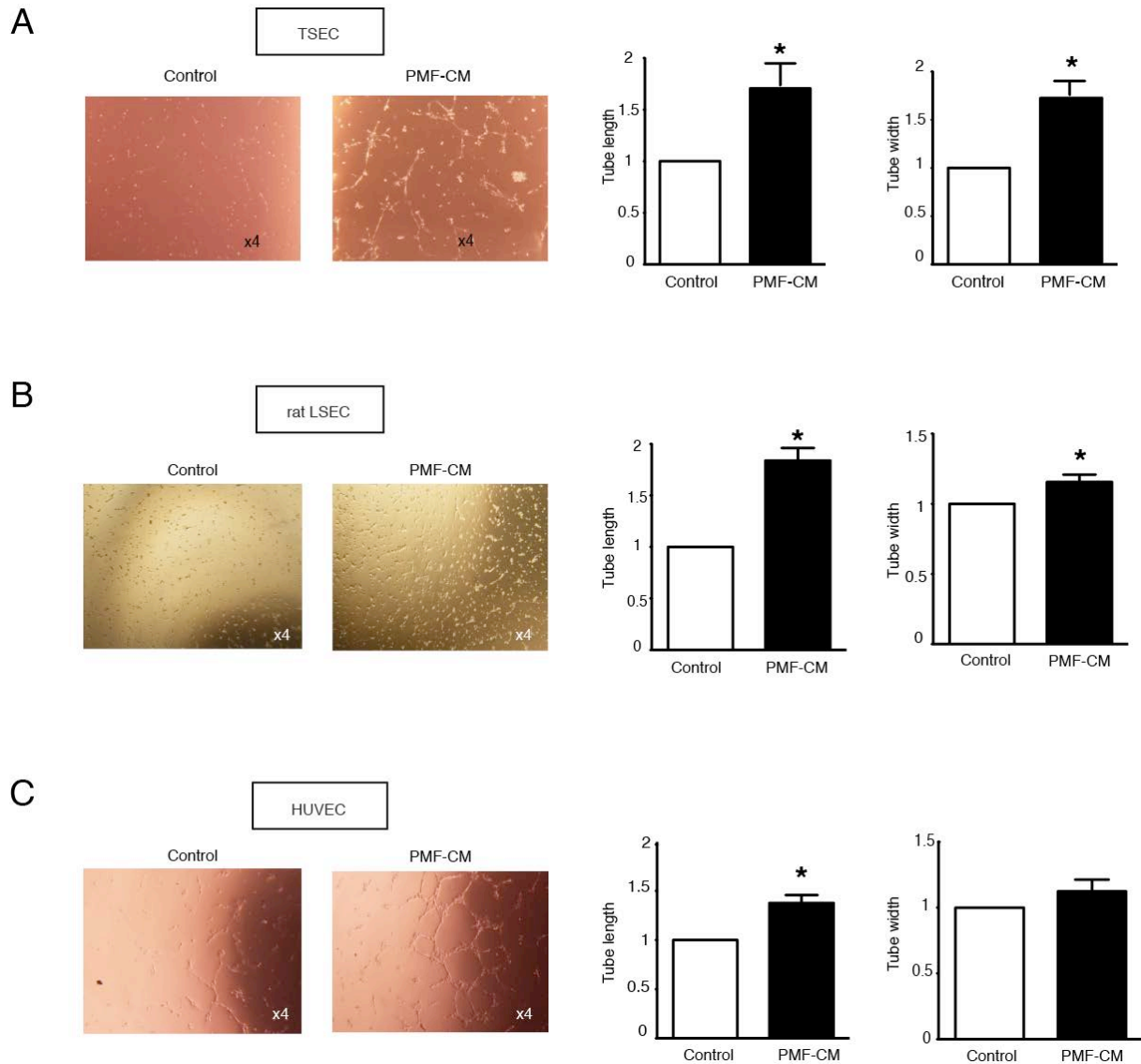


Figure 28 : Effet du milieu conditionné des MFP sur la tubulogenèse des cellules endothéliales.

Test de tubulogenèse sur Matrigel. 6 heures après l'incubation des cellules endothéliales sur Matrigel en présence du milieu contrôle ou du milieu conditionné des MFP, la longueur et la largeur des tubes a été mesurée avec un microscope à contraste de phase. A) Tubulogenèse des TSEC, n=7. B) Tubulogenèse des LSEC, n=7. C) Tubulogenèse des HUVEC, n=3. Les valeurs rapportées sont exprimées en ratio par rapport aux valeurs de la condition contrôle, arbitrairement fixée à 1 et représentent les moyennes +/- SEM. *p<0,05.

c) Effet du milieu conditionné des MFP sur l'angiogenèse *in vivo*

La capacité des MFP à influencer l'angiogenèse *in vivo* a été testée en utilisant la technique de l'implant sous-cutané de Matrigel chez la souris (figure 29). A leur retrait, l'examen macroscopique des implants montrait que ceux préparés avec le milieu basal contrôle contenaient peu ou pas de vaisseaux alors que ceux préparés avec le milieu conditionné des MFP contenaient plusieurs vaisseaux visibles. La concentration en hémoglobine, témoin de la vascularisation, dans les implants préparés avec le milieu conditionné des MFP était nettement supérieure à celle des implants préparés avec le milieu basal contrôle. Ces résultats montraient donc que les MFP sécrétaient des facteurs capables, *in vivo*, de recruter des cellules endothéliales distantes et de leur faire former de nouveaux vaisseaux.

L'expérience de l'implant de Matrigel a également été réalisée chez la souris immunodéficiente *nude*. Les résultats étaient similaires à ceux retrouvés chez la souris sauvage, montrant donc que la vascularisation induite *in vivo* par les MFP chez la souris n'est pas due à une inflammation secondaire à la réaction immunitaire en lien avec la différence d'espèce animale.

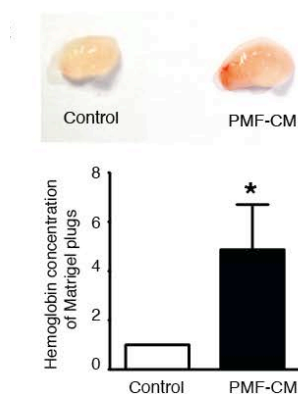


Figure 29 : Effet du milieu conditionné des MFP sur la vascularisation des implants de Matrigel chez la souris.

Les souris sauvages C57BL/6J ont subi l'injection sous-cutanée de 2 implants de Matrigel, un dans chaque flanc : un contenant le milieu contrôle et un contenant le milieu conditionné des MFP. Après 7 jours, les implants ont été retirés et la concentration en hémoglobine a été mesurée (n=15). Les photographies macroscopiques présentées sont représentatives de l'ensemble des implants retirés.

3) Les microparticules comme médiateur de l'action pro-angiogénique des MFP

L'analyse du milieu conditionné des MFP par cytométrie en flux a montré la présence de microparticules (MP), prouvant ainsi que les MFP étaient capables de sécréter des MP. Par une méthode de centrifugation suivie d'une filtration, nous avons pu extraire presque totalement les MP du milieu conditionné (figure 30 A).

Nous avons ensuite comparé l'effet du milieu conditionné des MFP avant et après extraction des MP en réalisant les mêmes tests d'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* que précédemment. L'extraction des MP du milieu conditionné des MFP diminuait significativement son effet positif sur la tubulogenèse des cellules endothéliales (figure 30 B, panel de gauche) et sur la vascularisation des implants de Matrigel (figure 30 B, panel de droite). Ceci montrait donc que l'effet pro-angiogénique des MFP impliquait l'action des MP. Néanmoins, l'effet sur la tubulogenèse induit par le milieu conditionné sans MP, bien qu'étant diminué, restait supérieur à l'effet induit par le milieu contrôle, montrant ainsi que l'effet pro-angiogénique des MFP n'était exercé que partiellement par leurs MP.

Nous avons ensuite testé l'effet direct des MP des MFP sur les cellules endothéliales. Les MP isolées du milieu conditionné des MFP et ajoutées aux TSEC entraînaient une augmentation significative de la tubulogenèse, prouvant ainsi leur pouvoir pro-angiogénique direct (figure 30 C).

Nous avons évalué le rôle du VEGF dans l'effet des MP. L'extraction des MP diminuait significativement la concentration en VEGF-A du milieu conditionné (figure 30 D). Ce résultat indiquait donc que les MP sécrétées par les MFP contenaient du VEGF-A, qui pouvait ainsi être délivré aux cellules cibles de ces MP. Pour tester cette hypothèse, les MP ont été isolées du milieu conditionné des MFP, marquées avec un traceur fluorescent, puis ajoutées aux cellules endothéliales en culture. Après 24 heures d'incubation, les cellules ont été lavées et examinées au microscope confocal. Les images ainsi obtenues ont montré que les MP produites par les MFP avaient été captées par les cellules endothéliales (figure 30 E, panel de gauche). Nous avons également examiné le statut d'activation du récepteur VEGFR-2, qui exerce l'effet pro-angiogénique du VEGF-A dans les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales exposées soit au milieu conditionné des MFP soit seulement aux MP qu'il contenait, montraient une activation du récepteur VEGFR-2, attestée par l'augmentation de l'expression de sa forme phosphorylée (figure 30 E, panel de droite).

Les MFP ont été transfectés avec un SiRNA approprié pour inhiber l'expression de VEGF-A. Nous avons vérifié l'efficacité de cette transfection : l'expression de l'ARNm ainsi que celle de la protéine VEGF-A était efficacement diminuées par la transfection, sans que cela ne modifie la sécrétion de MP par les cellules (figure 31).

Les TSEC, exposées aux MP dérivées des MFP transfectés avec SiRNA anti-VEGF-A formaient significativement moins de tubes que les TSEC exposées aux MP dérivées des MFP transfectées avec le SiRNA contrôle (figure 30 F). Cette expérience montrait donc que l'effet des MP sur la tubulogenèse était dépendante de VEGF-A. Néanmoins, nous ne pouvions exclure la possibilité que le SiRNA anti-VEGF-A puisse être transféré des MFP vers les cellules endothéliales *via* les MP et inhiber la sécrétion autocrine de VEGF-A dans les cellules endothéliales, conduisant ainsi à la diminution de leur capacité de tubulogenèse¹⁵⁷.

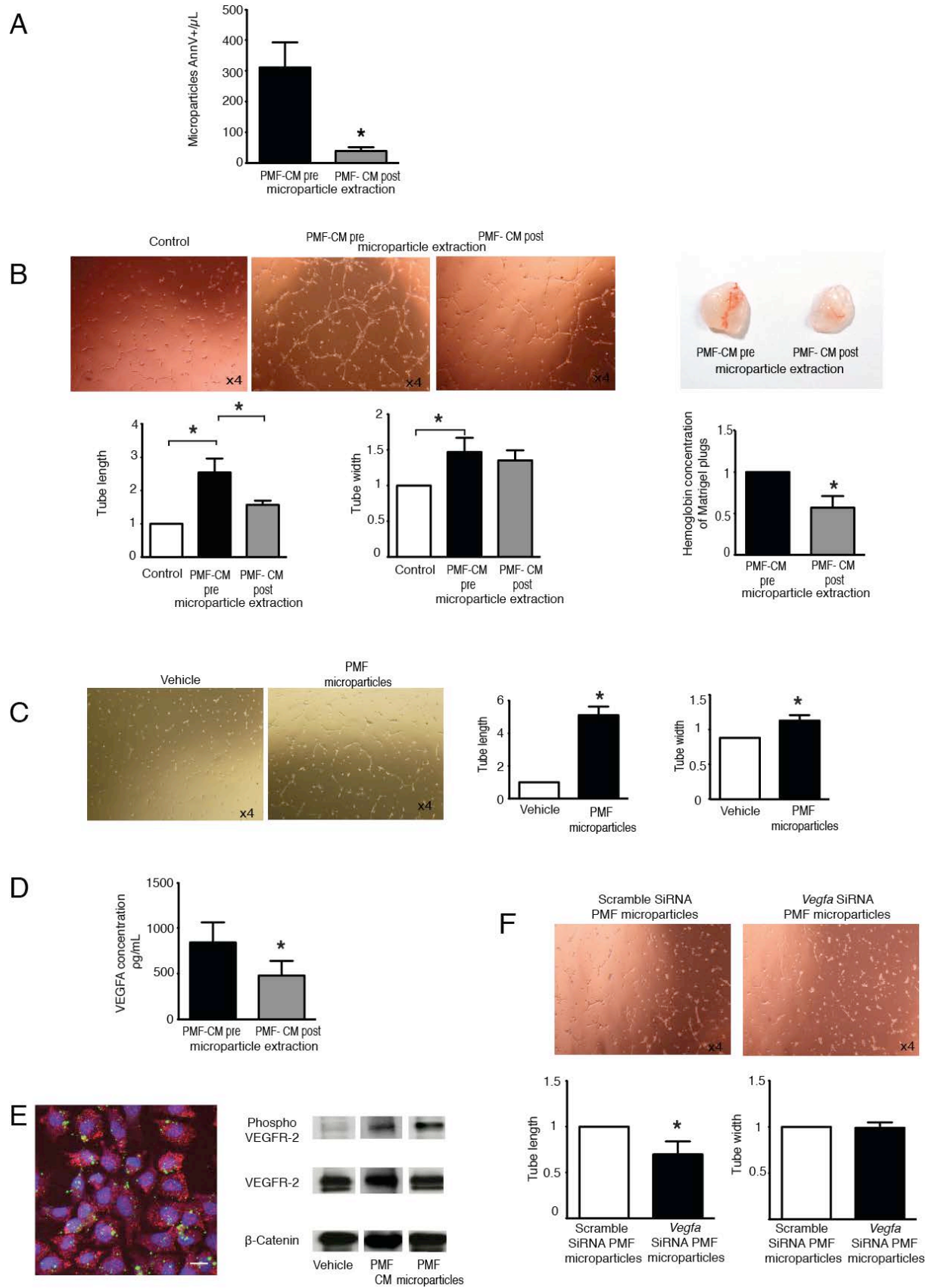


Figure 30: Rôle des microparticules dans l'effet pro-angiogénique des MFP.

Légende ci-après

Les microparticules (MP) ont été extraites du milieu conditionné des MFP (PMF-CM) par centrifugation et filtration. A) La présence de MP dans le PMF-CM et l'efficacité de la procédure d'extraction a été évaluée par cytométrie en flux (n=12). B) Les effets pro-angiogéniques du PMF-CM avant et après extraction des MP a été comparé lors des tests de tubulogénèse des TSEC sur Matrigel (panel de gauche, n=7) et d'implant sous-cutané de Matrigel chez la souris C57Bl/6 (panel de droite, n=7). D-F) Pour tester l'implication du VEGF dans l'effet des MP, D) les concentrations de VEGF-A ont été mesurées par ELISA dans le PMF-CM avant et après extraction des MP (n=7). E) Les TSEC ont été incubées avec des MP préalablement marquées par un traceur fluorescent vert. Après 24 heures, elles ont été marquées avec un anti-CD31 (rouge) et avec le Draq5 (bleu) et examinées avec un microscope confocal pour apprécier la capture des MP, barre d'échelle = 15 μ m (panel de gauche); les cellules incubées 20 minutes avec du PMF-CM ou avec les MP des MFP ont été lysées pour réaliser un Western Blot mesurant l'expression de (phospho)VEGFR-2, en utilisant la β -caténine comme contrôle (panel de droite). F) Les MFP ont été transfectés avec un SiRNA contrôle (*scramble*) ou avec un SiRNA anti-VEGF-A et après 3 jours, leurs MP ont été isolées de leur milieu conditionné par centrifugation et testées sur la tubulogénèse des TSEC (n=5). Toutes les données quantitatives sont exprimées en moyennes +/- SEM *p<0,05.

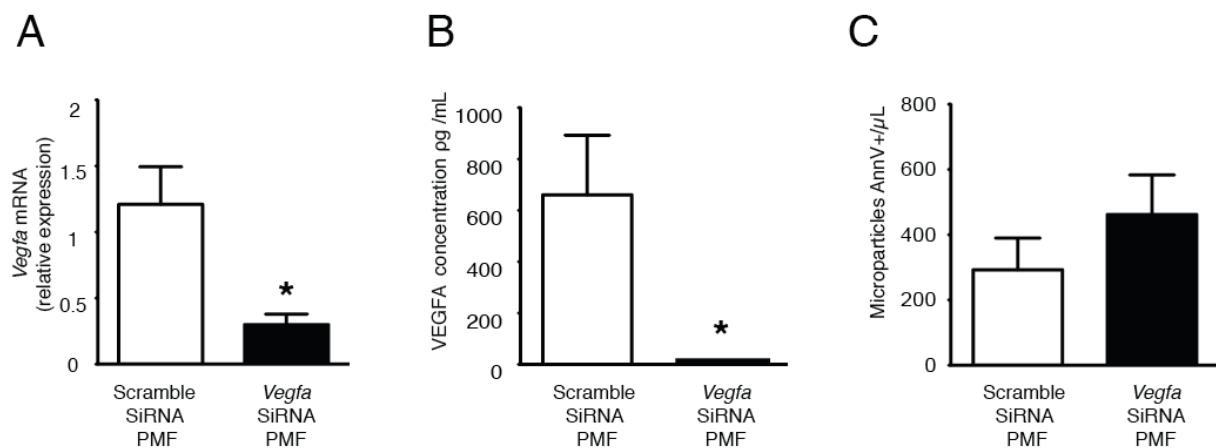


Figure 31: Effet de la transfection des MFP.

Les MFP ont été transfectés soit avec un SiRNA contrôle (*scramble*) soit avec un SiRNA anti-VEGF-A et après 3 jours nous avons mesuré A) leur expression de *Vegfa* par RT-PCR (n=9), B) leur sécrétion de VEGF-A par ELISA sur le milieu conditionné (n=8) et C) leur production de MP par analyse du milieu conditionné en cytométrie en flux (n=11). Les valeurs sont rapportées en moyennes +/- SEM. *p<0,05 par rapport aux MFP transfectés avec le SiRNA contrôle.

4) Facteurs favorisant le pouvoir angiogénique des MFP

a) L'hypoxie

L'hypoxie est le premier facteur stimulant l'angiogenèse et nous avons vu dans la première partie que ce phénomène était présent lors de la fibrogenèse hépatique. Des travaux précédents ont montré que l'hypoxie pouvait moduler les fonctions angiogénique et fibrogénique des CEF^{30, 112, 158}. Nous avons donc cherché à évaluer l'influence de l'hypoxie sur les fonctions angiogéniques des MFP.

Pour cela, nous avons placé les MFP à P1 avec du milieu dépourvu de SVF, dans des jarres d'hypoxie dans lesquelles la concentration en oxygène est inférieure à 1% (sachet AnaeroGen, Oxoid). Après différents temps d'incubation, nous avons recueilli les ARNm des cellules. Après 24 heures d'incubation, nous avons recueilli le milieu conditionné des cellules. Pour chaque boîte de cellule placée dans une jarre, nous avons une boîte de cellule cultivée en normoxie pour servir de contrôle.

Le milieu conditionné des MFP en hypoxie a été comparé à celui des MFP en normoxie lors du test de tubulogenèse des TSEC sur Matrigel. La tubulogenèse induite par le milieu des MFP en hypoxie était supérieure à celle induite par le milieu des MFP en normoxie (figure 32).

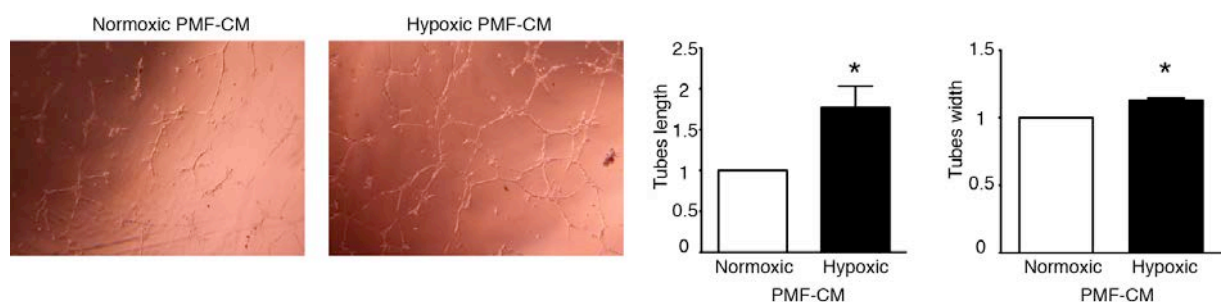


Figure 32 : Effet de l'hypoxie sur le pouvoir angiogénique des MFP.

Le test de tubulogenèse sur Matrigel a été réalisé en incubant les TSEC dans le milieu conditionné des MFP cultivés en normoxie ou en hypoxie. Les résultats sont exprimés en ratios par rapport à la condition contrôle, fixée arbitrairement à 1, et représentent les moyennes +/- SEM de 3 expériences indépendantes.

* $p < 0,05$ par rapport à la condition contrôle.

Pour identifier les facteurs moléculaires mis en jeu dans la stimulation du pouvoir pro-angiogénique des MFP par l'hypoxie, nous avons comparé l'expression des gènes de

l'angiogenèse entre les MFP en hypoxie et les MFP en normoxie par RT-PCR. Les résultats de l'analyse de la PCR ont montré qu'après 24 heures d'hypoxie, les MFP présentaient une augmentation de l'expression de VEGF-A et une diminution de l'expression de l'angiopoïétine-1 (figure 33). L'expression de la neuropilline-1(NRP-1) montrait une tendance à la diminution sous l'effet de l'hypoxie (figure 33). Pour vérifier que la régulation négative d'angiopoïétine-1 et de NRP-1 n'étaient pas un événement tardif mis en place secondairement après 24 heures d'hypoxie, nous avons évalué la cinétique d'expression de ces facteurs ainsi que celle de VEGF-A à différents temps après la mise en hypoxie : H6, H12, H18 et H24. La PCR réalisée à ces différents temps a confirmé que l'augmentation de l'expression de VEGF-A avait lieu dès H6 et allait croissant jusqu'à H24 alors que la diminution de l'expression d'angiopoïétine-1 et de NRP-1 était présente dès H6 et se majorait avec le temps jusqu'à H24 (figure 33).

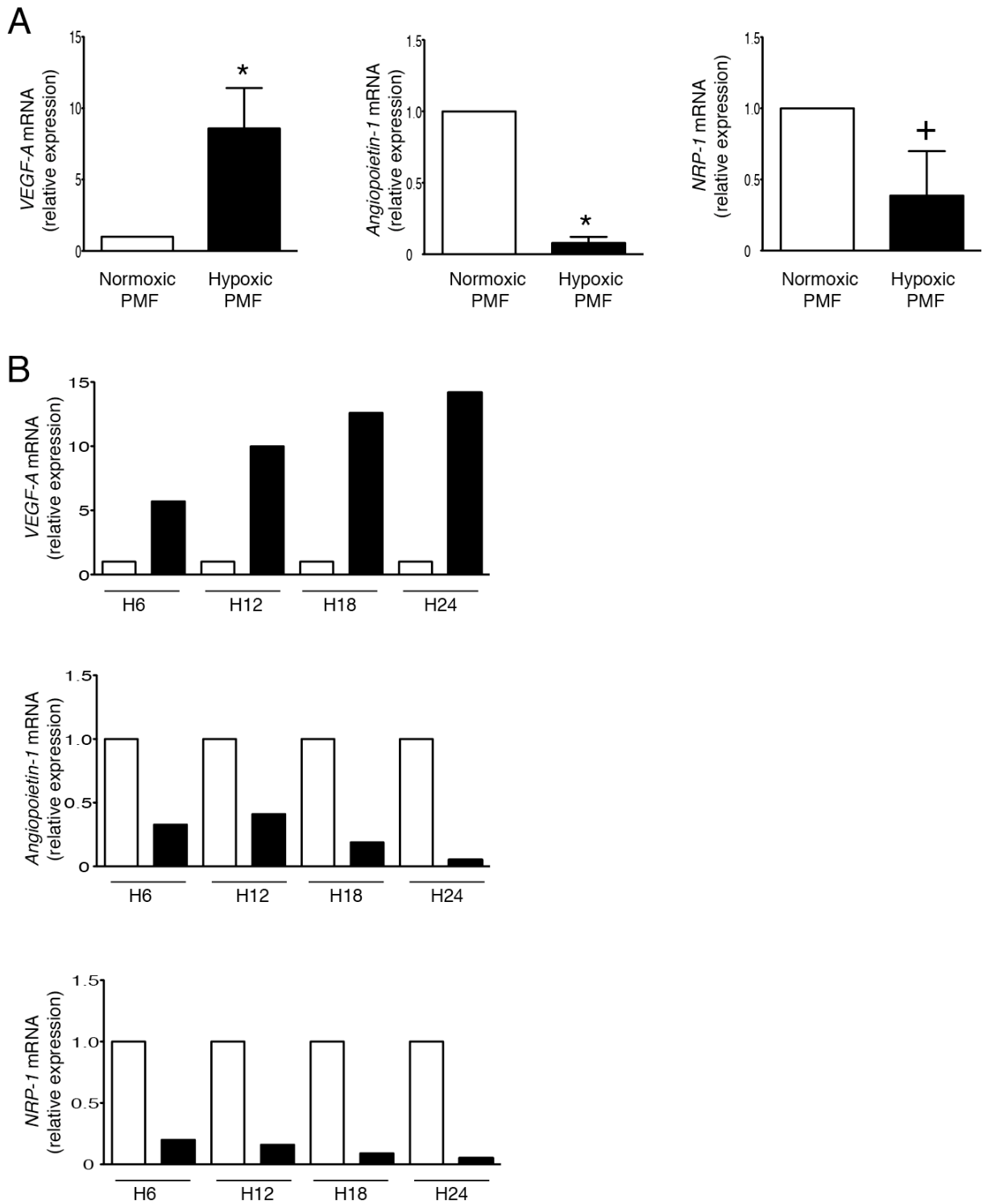


Figure 33 : Effet de l'hypoxie sur l'expression des gènes de l'angiogenèse dans les MFP.

A) L'expression de VEGF-A, angiopoïétine-1 et NRP-1 a été mesurée par RT-PCR dans les MFP en normoxie et en hypoxie, après 24h, n=3. B) La cinétique d'expression de ces gènes a été mesurée sur une seule préparation de MFP (n=1). Résultats exprimés en niveau d'expression d'ARNm rapportés à celui des MFP en normoxie, fixé à 1, et représentant la moyenne +/-SEM. * p<0,05, +p<0,10.

Bien que l'hypoxie soit capable d'augmenter le pouvoir pro-angiogénique des MFP, ce stimulus ne nous semblait pas très physiologique car les MFP, tout comme leurs précurseurs, sont localisés, du moins initialement, dans les espaces portes qui sont peu exposés à l'hypoxie du fait de l'arrivée directe dans les espaces portes du sang oxygéné de l'artère hépatique et de la veine portale. Néanmoins, il est probable qu'au cours de la fibrogenèse, les MFP migrent à l'intérieur du lobule hépatique où ils seront secondairement exposés à l'hypoxie, ce qui amplifiera encore leur pouvoir d'angiogénèse.

b) Les MFP issus de foie pathologique

Concernant les CEF, il a été montré que l'acquisition des capacités pro-angiogéniques allait de paire avec l'acquisition de leur capacités pro-fibrogéniques⁹². Ainsi, les CEF isolées à partir de foie pathologique avaient des propriétés angiogéniques supérieures à celles des CEF isolées à partir de foie sain²⁴. Nous avons donc cherché à savoir s'il en était de même pour les MFP, c'est à dire si leur propriétés angiogéniques étaient dépendantes de leur activation myofibroblastique.

Nous avons réalisé des isolements de MFP à partir de foie de rats ayant subi une ligature BDL ou seulement une laparotomie pour servir de contrôle (*sham*). L'isolement a été fait 14 jours après le geste chirurgical. Les MFP ont été cultivés de façon habituelle et leur milieu conditionné a été recueilli à P1 pour être utilisé dans les tests de tubulogenèse et de migration.

Le milieu conditionné des MFP issus de rats BDL induisait chez les cellules endothéliales une migration et une tubulogenèse supérieures à celles induites par le milieu conditionné des MFP issus de rat *sham* (figure 34). Pourtant, les analyses de PCR ont montré que l'expression des principaux gènes de l'angiogénèse n'était pas différente entre les MFP issus de rat BDL et les MFP issus de rat *Sham*. En effet, ni l'expression de VEGF-A ni celle de l'angiopoïétine-1 n'étaient significativement différente entre les 2 types de MFP (figure 35).

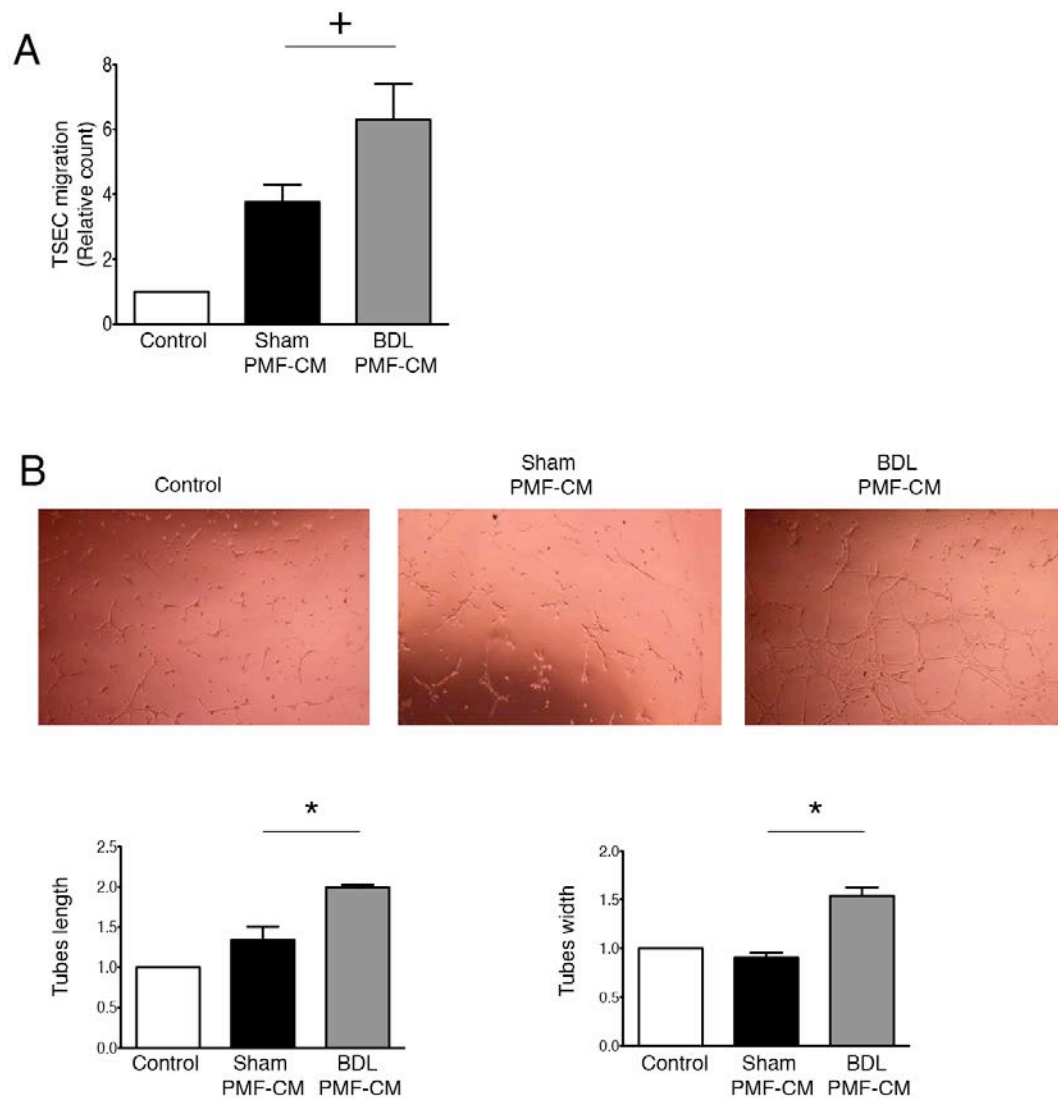


Figure 34 : Comparaison du pouvoir angiogénique des MFP issus de rat sham et des MFP issus de rat BDL.

Les TSEC ont été soumises au test de migration par chémo-attraction à travers un filtre, $n=6$ (A), ou au test de tubulogénèse sur Matrigel, $n=3$ (B) en présence de milieu contrôle ou de milieu conditionné provenant des MFP issus de rat *sham* ou de milieu conditionné provenant des MFP issus de rat BDL. Résultats exprimés en ratios par rapport à la condition contrôle, arbitrairement fixée à 1, et représentant les moyennes \pm SEM. * $p<0,05$, + $p<0,10$.

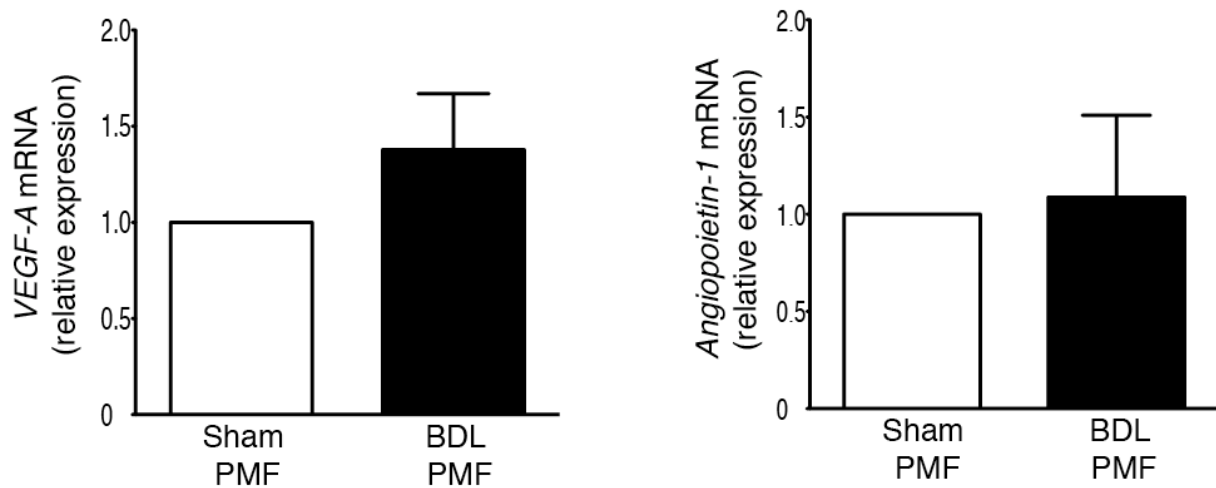


Figure 35 : Comparaison de l'expression des gènes de l'angiogenèse entre les MFP issus de rat *sham* et les MFP issus de rat BDL.

L'expression de VEGF-A et d'angiopoïétine-1 a été mesurée par RT-PCR dans les MFP issus de rat *sham* et issus de rat BDL, n=4/groupe. Résultats exprimés en niveau d'expression d'ARNm rapportés à celui des MFP issus des rats *sham*, fixé à 1, et représentant les moyennes +/-SEM.

En fait, la différence d'effet obtenu avec les milieux conditionnés des MFP issus de rat *sham* ou de rat BDL sur la migration et la tubulogénèse pouvait être expliquée par la prolifération plus importante des MFP issus de rat BDL. En effet, même si nous ne l'avons pas mesurée par un test dédié, nous avons remarqué lors de la culture que les MFP issus de rat BDL proliféraient plus rapidement et parvenaient plus tôt à confluence que les MFP issus de rats *sham*. Lorsque nous avons recueilli les milieux conditionnés des MFP, nous avons également recueilli les ARNm et chaque fois, la concentration en ARNm était plus importante pour la boîte de cellules provenant de rat BDL que pour la boîte de cellules provenant de rat *sham*, témoignant d'un nombre plus important de cellules.

Pour s'affranchir de ce biais, nous avons refait un test de tubulogénèse des TSEC en présence du milieu conditionné des MFP de rat *sham* ou de rat BDL mais cette fois, le milieu conditionné des MFP des rats BDL a été dilué du même facteur que le rapport de la concentration en ARNm BDL/*sham*. Ce test n'a pas montré de différence de la tubulogénèse entre les 2 conditions (figure 36).

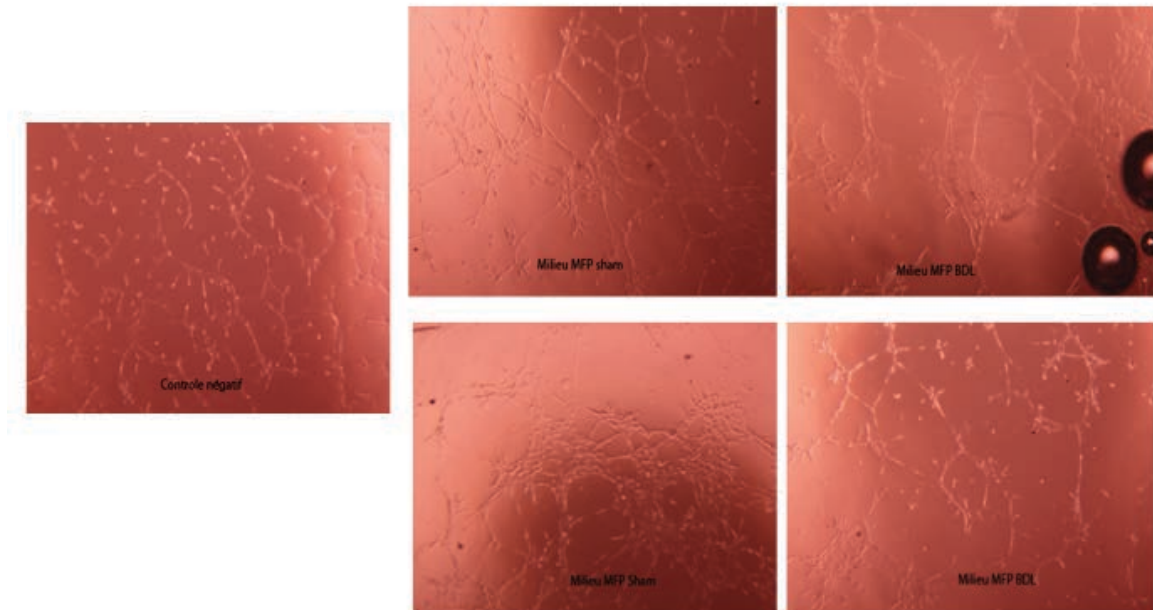


Figure 36 : Comparaison du pouvoir angiogénique des MFP issus de rat Sham et des MFP issus de rat BDL.

Les TSEC ont été soumises au test de tubulogénèse sur Matrigel, en présence de milieu contrôlé ou de milieu conditionné provenant des MFP issus de rat *sham* ou de milieu conditionné provenant des MFP issus de rat BDL. Le milieu conditionné des MFP issus de rat BDL a été dilué d'un facteur égal au rapport de la concentration d'ARNm des MFP BDL sur celle des MFP *sham*, afin de s'affranchir du biais de la densité cellulaire plus importante pour les MFP BDL.

En fait, le modèle de MFP issu de rat BDL est un mauvais modèle pathologique puisque le modèle de MFP de rat sain ou de rat *sham* est déjà un modèle pathologique. En effet, la culture sur surface plastique permet l'activation myofibroblastique spontanée des MFP. Autrement dit, le geste de BDL peut probablement modifier les MFP *in vivo* mais peu ou pas les MFP *in vitro* puisque ceux-ci sont déjà activés dans notre modèle.

L'absence de différence d'expression du collagène I entre les MFP issus de rat *sham* et ceux issus de rat BDL était en accord avec cette hypothèse (figure 37).

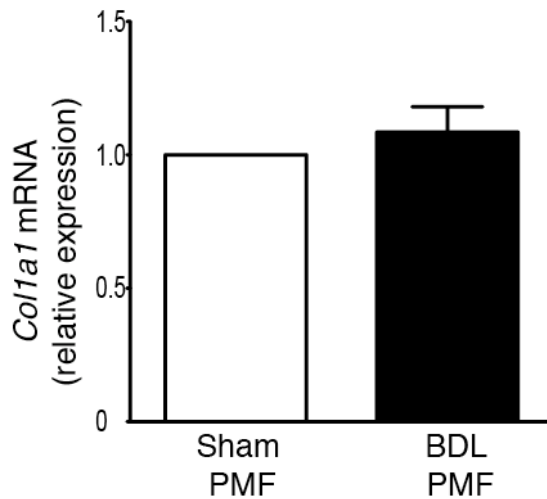


Figure 37 : Comparaison de l'expression de collagène I entre les MFP issus de rat Sham et les MFP issus de rat BDL.

L'expression de collagène I a été mesurée par RT-PCR dans les MFP issus de rat *sham* et dans les MFP issus de rat BDL, n=4 /groupe. Résultat exprimé en niveau d'expression d'ARNm rapportés à celui des MFP issus des rats *sham*, fixé à 1, et représentant la moyennes +/-SEM.

Nous avons donc changé de stratégie et au lieu de chercher à augmenter l'activation pro-fibrogénique des MFP qui nous semblait déjà maximale dans notre modèle, nous avons tenté de la diminuer en cultivant les MFP sur de surfaces de dureté inférieure à celle du plastique.

c) *Les MFP cultivés sur support mou*

Une autre équipe a montré que l'activation des MFP était dépendante de la tension mécanique et que, dans ces cellules cultivées sur des supports de polyacrylamide de dureté variable, l'expression des marqueurs d'activation myofibroblastique, notamment α -sma, augmentait en même temps que la dureté du support de culture ⁴⁴. Néanmoins, le modèle de MFP utilisé lors de cette étude, bien qu'isolé à partir du foie de rat, était différent de notre modèle : en effet, ces auteurs désignaient par MFP les myofibroblastes obtenus à partir de la culture sur support plastique des cellules individuelles issues de la digestion de l'arbre biliaire et non pas des cellules contenues dans les explants de canaux biliaires.

Nous avons à plusieurs reprises tenté d'ensemencer sur gels de polyacrylamide de dureté différente les canaux biliaires isolés à partir de foie de rats sains, selon le protocole détaillé en Annexe 1. Malheureusement, nous n'avons jamais réussi car les explants de canaux biliaires n'adhéraient pas à ces surfaces.

Nous avons donc changé de méthode. Au lieu d'essayer d'empêcher l'activation myofibroblastique des MFP, nous avons cherché à la réverser. En effet, une étude avait montré qu'il était possible de réverser l'activation des myofibroblastes de foie humain en les cultivant sur du Matrigel¹⁵⁹. Après avoir cultivé les canaux sur support plastique de façon habituelle, nous avons donc passé les MFP de P0 à P1 en les ensemençant sur du Matrigel. Le changement de support entraînait une modification rapide de la morphologie des cellules, observée au microscope optique à contraste de phase. Les cellules devenaient rondes et formaient des amas cellulaires, la prolifération cellulaire devenait nulle (figure 38).

Nous avons analysé par PCR l'expression des gènes de l'angiogenèse et de la fibrogenèse dans ces MFP cultivés sur Matrigel et l'avons comparé à celle des mêmes cellules cultivées sur plastique. L'expression de VEGF et de NRP-1 était augmentée dans les MFP cultivés sur Matrigel par rapport aux MFP cultivés sur plastique (figure 38). L'expression d'angiopoïétine-1 et de PlGF n'était pas modifiée significativement (figure 38). Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative pour l'expression des gènes de la fibrogenèse : α -sma et collagène I (figure 38). En effet, la variabilité était trop importante et nous n'avons réalisé que 3 expériences de ce type : 2 sur 3 montraient une diminution de l'expression d' α -sma et du collagène I par la culture sur Matrigel alors que la 3ème expérience montrait une augmentation de ces marqueurs induite par la culture sur Matrigel. La faible densité cellulaire, due à l'absence de prolifération des MFP sur Matrigel, rendait très difficile le recueil des ARNm nécessaire à la réalisation des PCR.

Néanmoins, ces expériences permettaient de conclure que la culture des MFP sur un support mou entraînait l'augmentation de l'expression de certains gènes pro-angiogéniques sans moduler significativement les gènes de la fibrogenèse.

Nous n'avons pas pu préparer du milieu conditionné des MFP cultivés sur Matrigel car le fait de les placer à 0% de SVF entraînait la mort des cellules sur Matrigel. Ainsi, l'influence de la dureté du support de culture sur les fonctions angiogéniques des MFP n'a pu être testée.

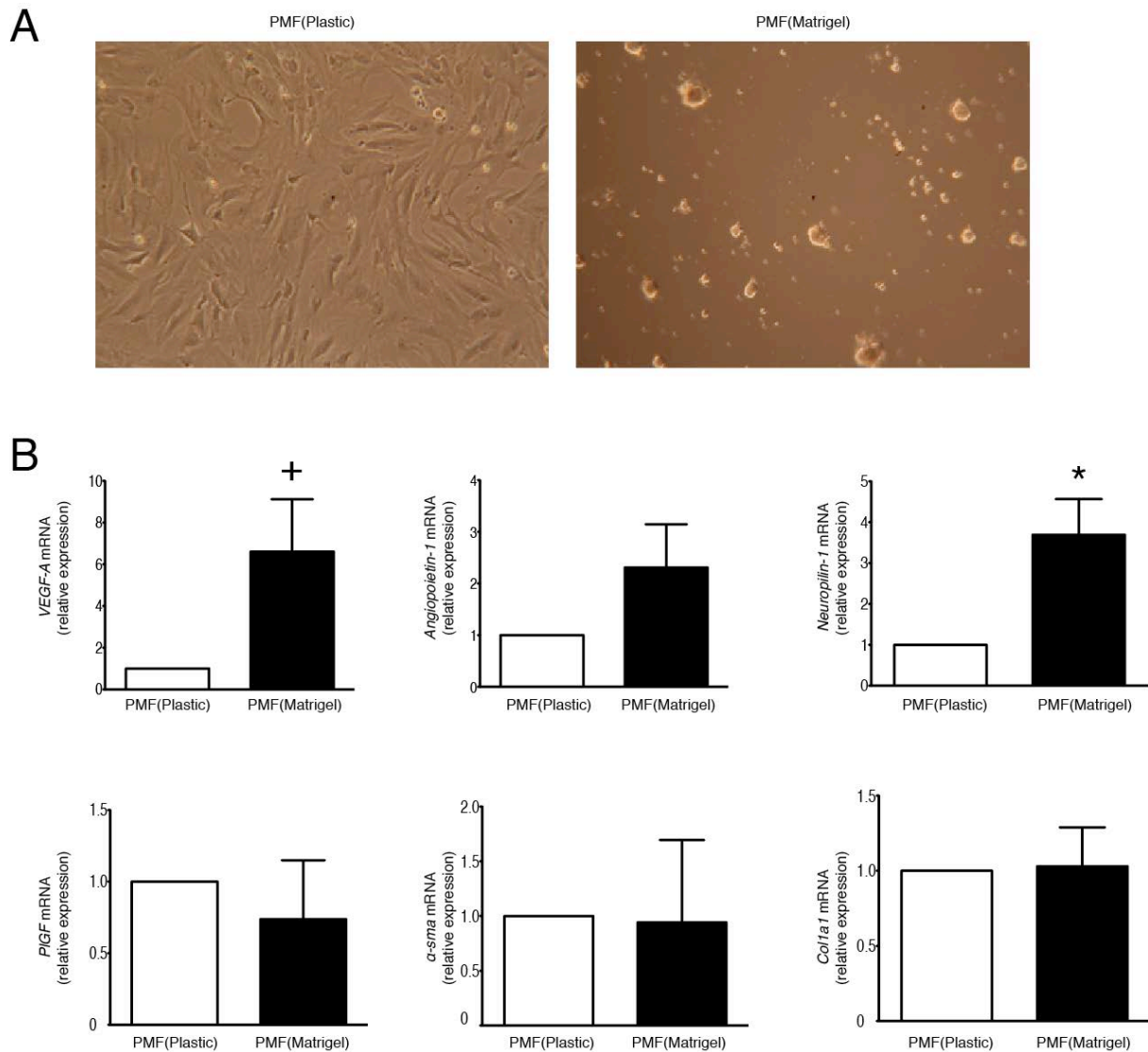


Figure 38 : Effets de la culture sur support mou.

A) Photographies des MFP cultivés sur support plastique ou sur Matrigel observés au microscope à contraste de phase. B) L'expression de VEGF, angiopoïétine-1, NRP-1, PIGF, α -sma et collagène I a été mesurée par RT-PCR dans les MFP cultivés sur support plastique et sur Matrigel, n=3/groupe. Résultats exprimés en niveaux d'expression d'ARNm rapportés à ceux des MFP cultivés sur plastique, fixés à 1, et représentant les moyennes +/-SEM. * p<0,05 ; + p<0,10.

Au total, cette expérience nous a montré que chez les MFP, la régulation des gènes de l'angiogenèse n'allait pas dans le même sens que celle des gènes de la fibrogenèse, suggérant que dans les MFP, les propriétés pro-angiogéniques pourraient être indépendantes des propriétés pro-fibrogéniques.

d) Rôle des cholangiocytes

Dans le foie cirrhotique, les MFP étaient retrouvés localisés à proximité des cholangiocytes des canaux biliaires en prolifération (figure 20). Cette proximité suggérait une possible interaction entre les 2 types cellulaires. De plus, dans des travaux antérieurs, notre équipe a montré que les cholangiocytes pouvaient moduler la fonction pro-fibrogénique des MFP. En effet, *via* la sécrétion de PDGF-BB, les cholangiocytes étaient capables de stimuler la différenciation myofibroblastique, la prolifération et la migration des MFP³⁵. Ainsi, nous avons cherché à savoir si les cholangiocytes étaient également capables de moduler la fonction pro-angiogénique des MFP. Pour cela, nous avons utilisé le modèle des NRC. Cette lignée cellulaire possède des caractéristiques proches de celles des cholangiocytes présents dans les foies pathologiques notamment la capacité de prolifération¹⁵⁴. Nous avons tout d'abord préparé du milieu conditionné provenant des NRC. Nous avons ensuite stimulé les MFP par le milieu conditionné des NRC pendant 30 minutes puis les MFP ont été lavées plusieurs fois et remis en culture avec du milieu neuf dépourvu de SVF afin de re-préparer du milieu conditionné propre aux MFP. La stimulation des MFP par les NRC augmentait leur effet pro-angiogénique, mesuré par la réponse des cellules endothéliales à leur milieu conditionné lors des tests de tubulogenèse *in vitro* et d'implant de Matrigel *in vivo* (figure 39). Le milieu conditionné des MFP stimulés par un autre type cellulaire (les hépatocytes) n'entraînait aucun effet additionnel sur la tubulogenèse par rapport à celui des MFP non stimulés, prouvant donc ici la spécificité de l'effet des cholangiocytes (figure 40).

Nous avons voulu comprendre par quels mécanismes les cholangiocytes pouvaient augmenter le pouvoir pro-angiogénique des MFP. La stimulation par les cholangiocytes entraînait une augmentation significative de l'expression de l'ARNm du VEGF-A dans les MFP (figure 41). De même, la stimulation par les cholangiocytes était associée à une augmentation de la concentration de la protéine VEGF-A dans le milieu conditionné des MFP (figure 41). Enfin, sous l'effet de la stimulation par les cholangiocytes, la production de MP par les MFP était significativement augmentée (figure 41). Nous avons donc déduit de ces résultats que les cholangiocytes étaient capables d'augmenter les effets pro-angiogéniques des MFP *via* une augmentation à la fois de la synthèse de VEGF-A et de la production de MP.

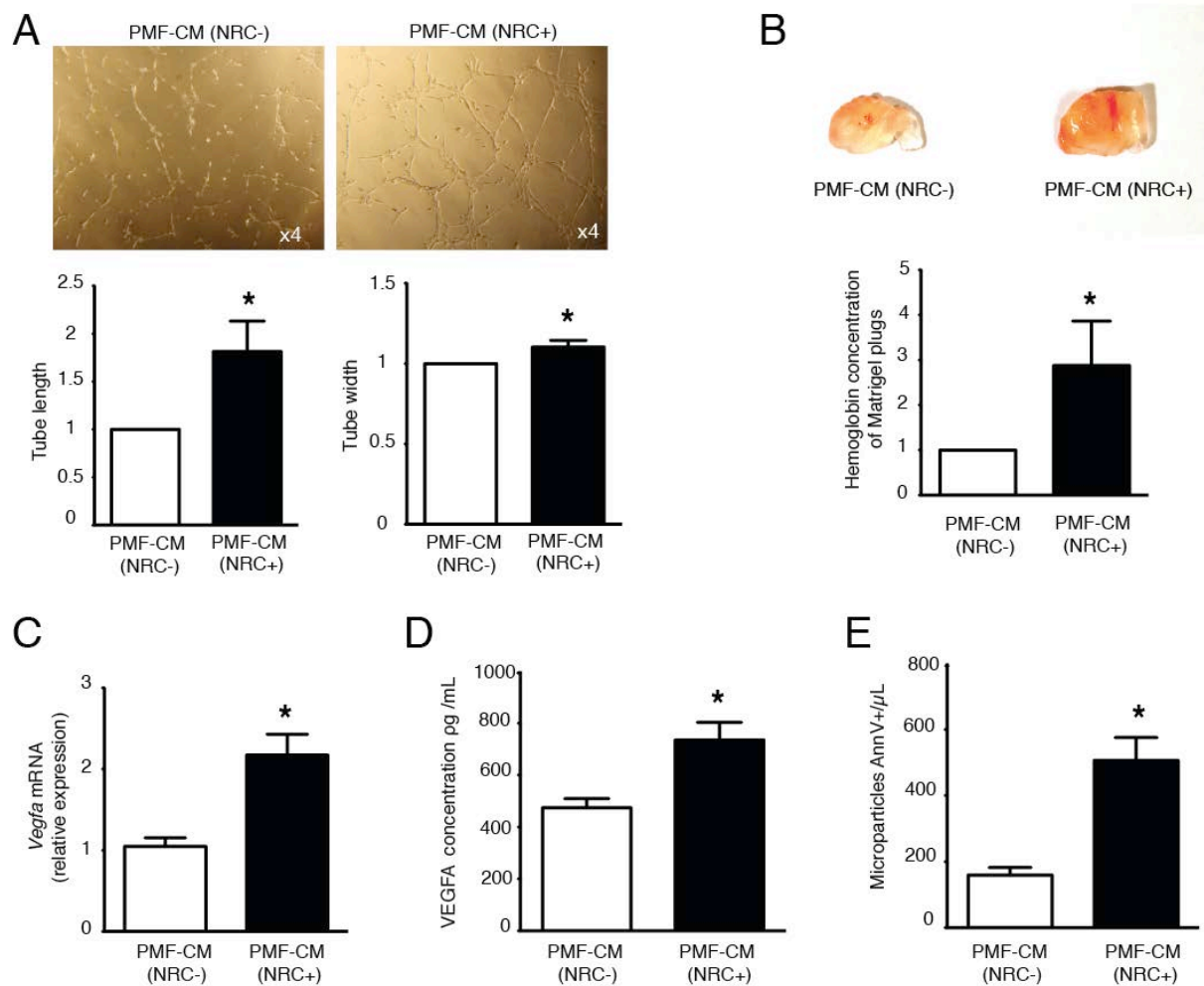


Figure 39 : Stimulation des propriétés angiogéniques des MFP par les cholangiocytes.

Les MFP ont été pré-incubés avec le milieu conditionné des NRC ou avec du milieu contrôle et les effets du milieu conditionné résultants (PMF-CM(NRC+) et PMF-CM(NRC-)) ont été comparés A) dans le test de tubulogénèse des TSEC sur Matrigel (n=6) et B) dans l'angiogénèse mesurée par le test d'implant de Matrigel chez la souris (n=20). Les MFP exposés ou non au milieu conditionné des NRC ont été comparés pour C) l'expression de Vegfa, mesurée par RT-PCR (résultats rapportés aux valeurs des cellules NRC-), D) la sécrétion de VEGF-A, quantifiée par ELISA sur le milieu conditionné (n=7), et pour E) la production de microparticules, quantifiée par cytométrie en flux dans le milieu conditionné (n=10). Toutes les valeurs sont exprimées en moyennes +/- SEM.

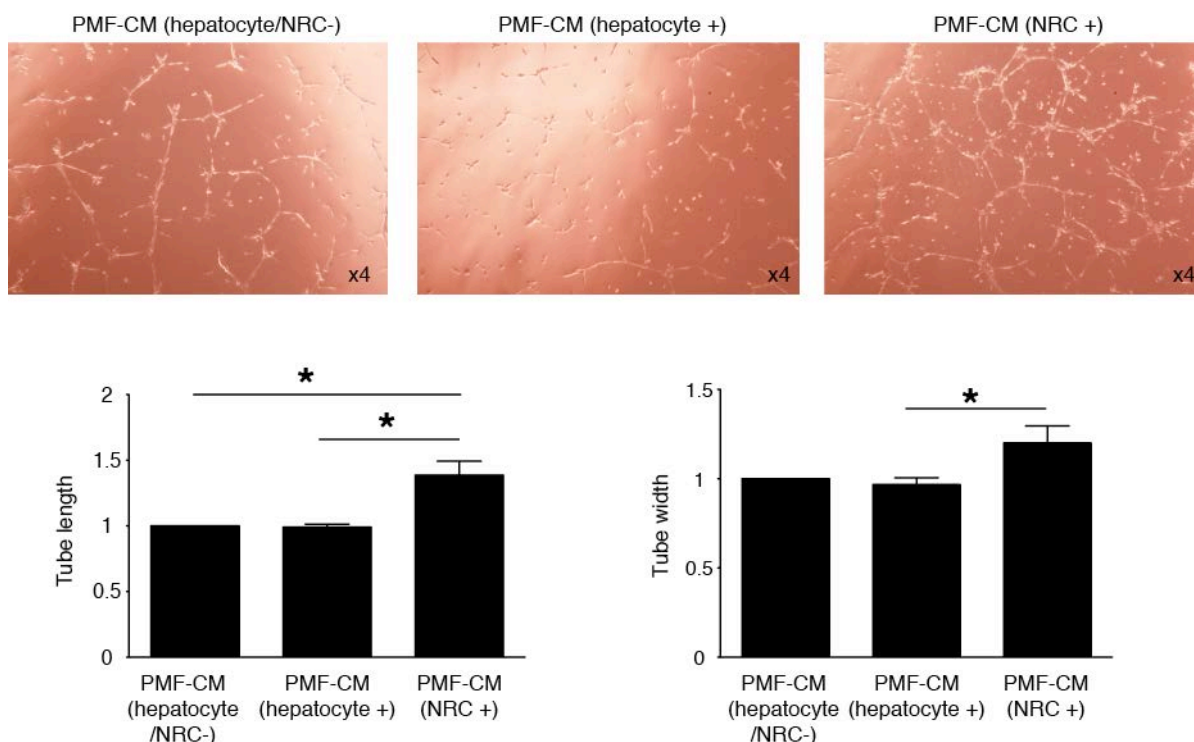


Figure 40 : Effet de la stimulation des MFP par les hépatocytes.

Les MFP ont été pré-incubés avec le milieu conditionné provenant des hépatocytes primaires de rat ou des NRC ou avec du milieu contrôlé et les effets des milieux conditionnés en résultant (PMF-CM (hepatocyte+), PMF-CM (NRC+) and PMF-CM (hepatocyte/NRC-)) ont été comparés par test de tubulogénèse des TSEC sur Matrigel (n=3). Les valeurs sont reportées en moyennes +/- SEM; * $p < 0.05$.

Nous avons également étudié l'influence des cholangiocytes sur les propriétés fibrogéniques des MFP. Nous avons comparé l'expression des gènes d' α -sma et du collagène I, mesurée par PCR entre les MFP stimulés par les NRC et les MFP non stimulés. Alors que l'expression du collagène I n'était pas modifiée, celle d' α -sma était significativement diminuée par la stimulation par les NRC (figure 41). Ainsi les cholangiocytes étaient capables de diminuer l'activation myofibroblastique des MFP. Ce résultat était en accord avec la modification du phénotype cellulaire des MFP observée après leur stimulation par le milieu des NRC (figure 41). En effet, la morphologie des MFP stimulés par les NRC était différente de celle des MFP non stimulés : les prolongements cytoplasmiques ainsi que l'étalement des MFP étaient diminués sous l'effet des cholangiocytes. Ainsi, la stimulation des fonctions pro-angiogéniques des MFP par les cholangiocytes était accompagnée d'une diminution de leur activation myofibroblastique. Les propriétés pro-fibrogéniques et pro-angiogéniques pouvaient donc évoluer de façon dissociée dans les MFP sous l'effet des cholangiocytes.

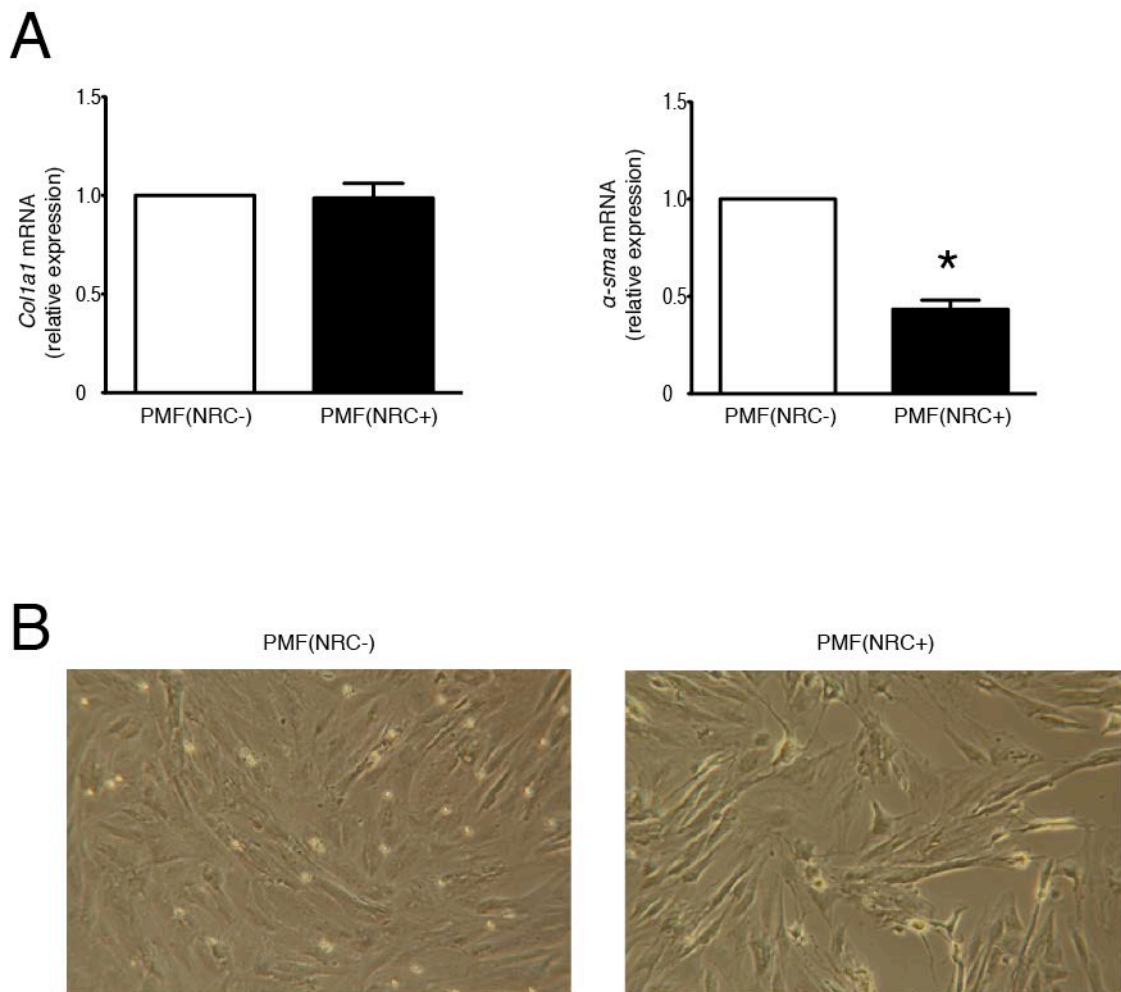


Figure 41 : Modulation des propriétés pro-fibrogéniques des MFP par les cholangiocytes.

A) Les MFP exposés ou non au milieu conditionné des NRC (PMF(NRC+) et PMF(NRC-)) ont été comparés pour leur expression des gènes collagène I et α -sma, mesurée par RT-PCR, n=15. Toutes les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SEM. B) Photographies des cellules acquises au microscope à contraste de phase après 24 heures de stimulation des MFP par milieu basal contrôle ou par le milieu des NRC.

Au total, l'ensemble de ces résultats nous a permis de conclure que les MFP étaient capables de stimuler l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*, en agissant sur les cellules endothéliales par au moins 2 mécanismes : 1) la formation de jonctions inter-cellulaires de types jonctions *gap* ou desmosomes qui permettent la maturation vasculaire et 2) l'activation de la voie VEGFR-2 par la sécrétion de MP contenant VEGF-A. La fonction pro-angiogénique des MFP était amplifiée par les cholangiocytes qui étaient capables d'agir sur le 2^e mécanisme (figure 42). De façon intéressante, les cholangiocytes ont montré une diminution de l'activation myofibroblastique des MFP *in vitro*. Les capacités pro-angiogéniques des MFP étaient également augmentées sous l'effet de l'hypoxie. Les conséquences sur la fibrogenèse de cette angiogenèse médiée par les MFP restent à être déterminées.

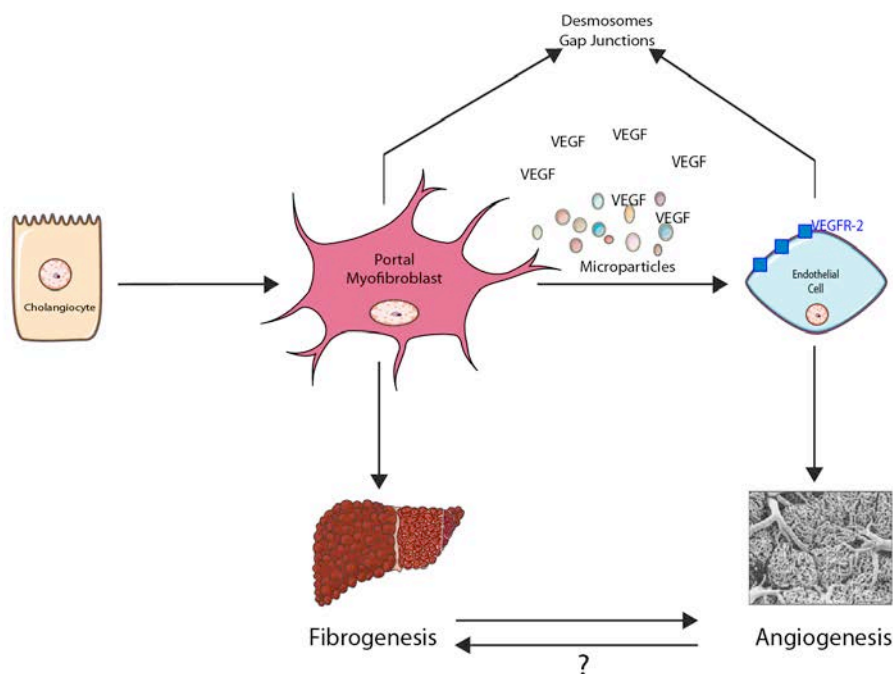


Figure 42 : Pouvoir pro-angiogénique des MFP.

Troisième partie

Conclusions

et perspectives

I. Conclusions

Jusque récemment, les CEF étaient considérées comme l'unique source de myofibroblastes hépatiques et certains auteurs considèrent toujours aujourd'hui que CEF et myofibroblastes du foie sont des termes synonymes. Les MFP n'ont été identifiés que récemment et leurs propriétés ont été beaucoup moins étudiées que celles des CEF. Le principal obstacle à l'étude des MFP était l'absence de marqueur permettant de les distinguer avec certitude des CEF-MF. Alors que plusieurs travaux ont rapporté des preuves de l'implication des MFP dans la fibrogenèse hépatique, aucun ne s'est intéressé à évaluer l'implication de ces mêmes cellules dans l'angiogenèse, processus étroitement lié à la fibrogenèse et qui participe à la formation de la cirrhose. En réalisant l'analyse comparative du transcriptome des MFP et des CEF-MF, notre équipe avait précédemment mis en évidence plusieurs gènes exprimés préférentiellement dans les MFP, parmi lesquels se trouvait *col15a1* (thèse de Nelly Bosselut).

Lors de mon travail de thèse, nous nous sommes d'abord attachés à caractériser de façon précise le modèle cellulaire de MFP utilisé par notre équipe. Ce modèle était constitué de MFP primaires obtenus à partir de la culture d'explants de canaux biliaires de foie de rat sain. Les MFP ainsi obtenus provenaient de l'activation myofibroblastique des cellules mésenchymateuses portales présentes dans et/ou autour des canaux biliaires. Nous avons ensuite validé *Col15a1* comme marqueur spécifique des MFP, car non exprimé par les autres types cellulaires du foie, y compris les CEF et les CEF-MF, contrairement à la Fibuline-2, qui avait été précédemment rapportée comme marqueur des MFP dans la littérature. Contrairement à α -sma, l'expression de *Col15a1* n'était pas dépendante de l'activation myofibroblastique. Nous nous sommes ensuite servis du *Col15a1* pour suivre l'évolution des MFP dans le foie au cours de la fibrogenèse. Nous avons montré que, chez l'homme comme chez l'animal, dans des pathologies hépatiques d'origine biliaire et non biliaire, l'expression hépatique de *Col15a1* était augmentée aux stades avancés de fibrose, traduisant ainsi la prolifération des MFP, et était corrélée avec l'augmentation du nombre de cellules endothéliales. L'immuno-histochimie réalisée sur le foie humain a permis de montrer que le foie sain contenait de rares cellules positives pour *Col15a1* qui étaient situées dans les espaces portes à proximité des canaux biliaires et des canaux de Hering. Ces cellules n'étaient pas

myofibroblastiques et correspondaient donc vraisemblablement aux précurseurs des MFP. Le foie cirrhotique humain contenait de nombreuses cellules positives pour Col15a1. Ces cellules étaient myofibroblastiques, puisqu'elles exprimaient α -sma, et étaient disposés autour des vaisseaux dans les septa fibreux, à proximité des canaux biliaires en prolifération. Ces résultats suggéraient donc un rôle des MFP dans l'angiogénèse.

Nous avons ensuite évalué les propriétés angiogéniques des MFP en utilisant notre modèle cellulaire. Les MFP étaient capables de stimuler la tubulogénèse des cellules endothéliales en co-culture. Elles pouvaient établir avec les cellules endothéliales des jonctions inter-cellulaires de type jonctions *gap* et desmosomes. Ainsi les MFP se comportaient comme des péricytes et intervenaient dans la stabilisation des vaisseaux néoformés. De plus, le milieu conditionné des MFP était capable de stimuler la migration et la tubulogénèse des cellules endothéliales ainsi que la vascularisation des implants sous-cutanés de Matrigel chez la souris, montrant donc que les MFP sécrétaient des facteurs capables de promouvoir l'angiogénèse *in vitro* et *in vivo*. L'effet pro-angiogénique des MFP était en partie exercé par leurs MP contenant du VEGF-A et capables d'activer la voie VEGFR-2 dans les cellules endothéliales. Nous avons cherché à identifier les stimuli capables de déclencher les fonctions angiogéniques des MFP. L'hypoxie augmentait la tubulogénèse induite par le milieu conditionné des MFP. Les MFP issus des rats BDL montraient des capacités angiogéniques supérieures à celles des MFP issus de rat *sham* mais ce résultat pouvait être dû à un biais de différence de prolifération. Enfin, les cholangiocytes étaient capables de stimuler les fonctions angiogéniques des MFP en augmentant leur sécrétion de VEGF-A et leur production de MP. Cette régulation positive de la fonction angiogénique des MFP par les cholangiocytes s'accompagnait d'une régulation négative de leur activation myofibroblastique.

Au total, les MFP apparaissaient comme des cellules clefs dans le remodelage vasculaire associé à la cirrhose. L'ensemble de nos résultats est résumé par la figure 43.

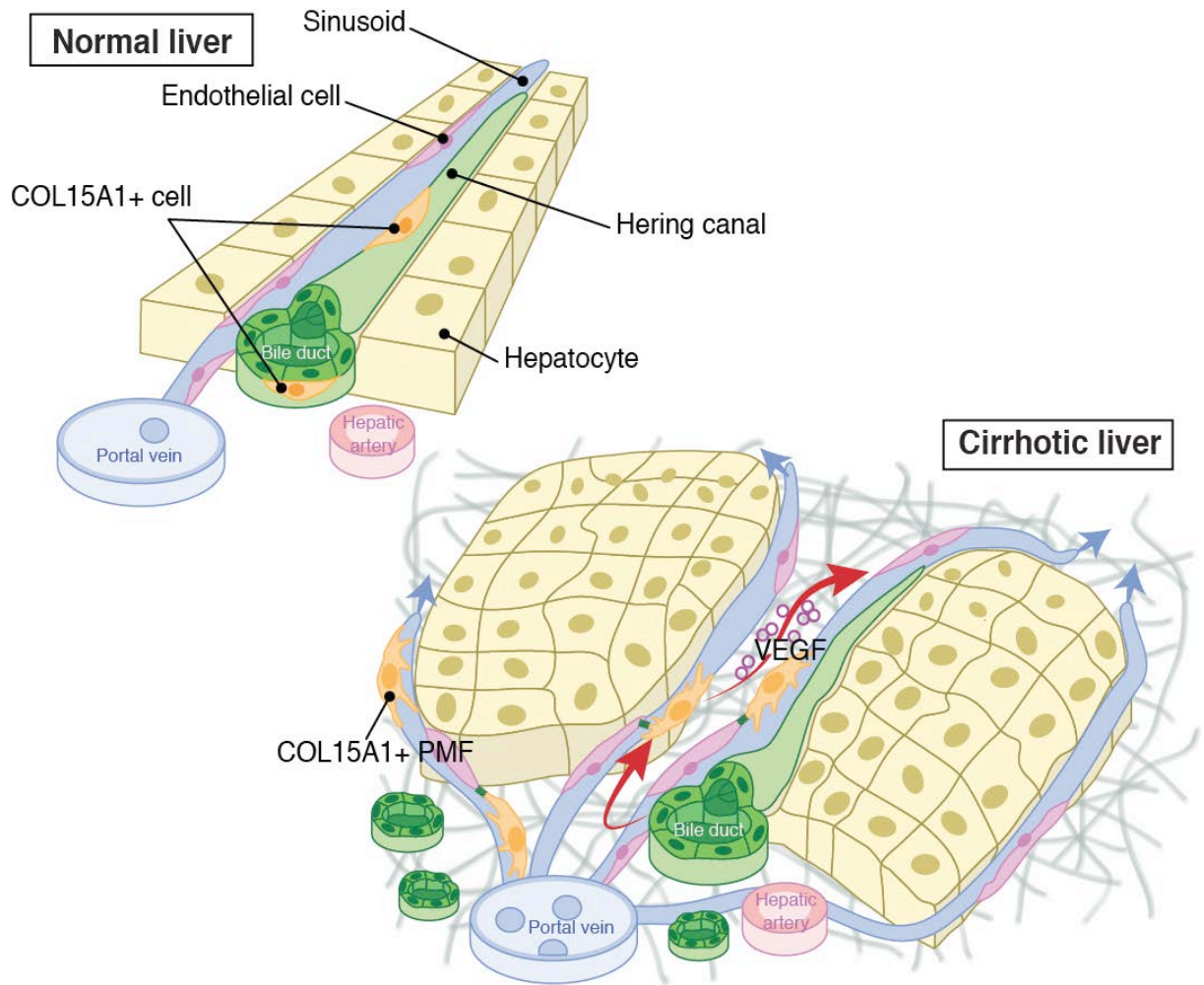


Figure 43 : Contribution des MFP au remodelage vasculaire survenant lors de la progression de la fibrose hépatique.

Le foie normal contient un petit nombre de cellules positives pour COL15A1, qui sont adjacentes aux canaux biliaires et aux canaux de Hering, dans les espaces portes. En cas de fibrose du foie, les cellules positives pour COL15A1 donnent naissance aux MFP. Les MFP communiquent avec les cellules endothéliales *via* des microparticules contenant VEGF-A et en agissant comme des cellules murales pour les vaisseaux néo-formés. Ainsi, les MFP favorisent le remodelage vasculaire et font progresser la fibrose des espaces portes vers l'intérieur du lobule, aboutissant à la constitution de la cirrhose.

II. Perspectives

Suite à ce travail, nous envisageons de poursuivre l'étude de l'angiogenèse associée à la fibrose hépatique.

Dans une première phase, observationnelle, nous projetons d'analyser l'angiogenèse dans les différentes maladies du foie (cirrhoses de différentes étiologies chez l'homme et différents modèles de fibrose hépatique, chez l'animal). Nous nous attendons à montrer des différences quantitatives et qualitatives de l'angiogenèse en fonction de l'étiologie de la maladie du foie et donc dans les différents modèles animaux. Nous chercherons si ces différences sont corrélées à la présence des MFP.

Dans une seconde phase, interventionnelle, nous étudierons les conséquences de la stimulation de l'angiogenèse sur la fibrose dans un modèle particulier: la souris MDR2 KO. Cette souris constitue un modèle de cholangite sclérosante primitive. La protéine MDR2 est l'équivalent murin de la protéine humaine MDR3 qui est le transporteur des phospholipides. La mutation de MDR2 à l'état homozygote chez la souris entraîne l'absence de cette protéine et par conséquent l'absence de phospholipides dans la bile. Les souris MDR2 KO développent spontanément des lésions de cholangite avec une fibrose biliaire rapidement progressive aboutissant à la constitution d'une cirrhose à l'âge de 12 semaines. L'angiogenèse n'a jamais été évaluée dans le foie de ces souris, ni même dans le foie des patients atteints de cholangite sclérosante primitive. Nos résultats préliminaires montrent que dans le foie des souris MDR2 KO, alors que la vascularisation est augmentée, traduisant la manifestation d'une angiogenèse, l'expression du VEGF est diminuée. Nous projetons donc de stimuler l'angiogenèse au moyen de mini-pompes osmotiques délivrant du VEGF de façon continue dans le péritoine de ces souris. Nous étudierons les conséquences de ce traitement sur l'angiogenèse et la fibrose hépatiques.

Dans ce travail, nous avons identifié Col15a1 comme nouveau marqueur des MFP mais nous n'avons pas étudié sa fonction. Col15a1 appartient au groupe des collagènes non fibrillaires et est principalement exprimé dans le cœur et le muscle squelettique où il assure la résistance aux pressions mécaniques¹⁶⁰. L'absence de Col15a1 chez la souris entraîne une myopathie liée à une anomalie des vaisseaux capillaires musculaires¹⁶⁰. D'autre part, il a été montré que Col15a1 pouvait constituer une matrice pro-angiogénique pour les cellules

endothéliales ¹⁶¹. Nous pouvons donc raisonnablement supposer que Col15a1 serait impliqué dans l'angiogenèse hépatique et plus particulièrement dans les fonctions angiogéniques des MFP. Le fait que les gènes co-exprimés avec Col15a1 dans les MFP soient liés à la régulation de la pression artérielle et la prolifération des cellules musculaires lisses est un argument en faveur de cette hypothèse (figure 14). Nous projettons donc d'étudier la fonction du col15a1 dans les MFP. Pour cela, nous testerons les capacités angiogéniques et fibrogéniques des MFP dans lesquels nous aurons inhibé l'expression de Col15a1 par SiRNA. Nous évaluerons également la fonction de Col15a1 *in vivo* en étudiant le foie de souris KO pour col15a1 chez lesquelles nous aurons induit la fibrose hépatique par BDL ou CCl4.

Bibliographie

1. Isse K, Lesniak A, Grama K, et al. Preexisting epithelial diversity in normal human livers: a tissue-tethered cytometric analysis in portal/periportal epithelial cells. *Hepatology* 2013;57:1632-43.
2. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* 2012;180:1340-55.
3. Lemoine S, Cadoret A, El Mourabit H, et al. Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochimica et biophysica acta* 2013;1832:948-54.
4. Lemoine S CA, Bosselut N, Housset C, Wendum D, Thabut D. Fibrose Hépatique. *EMC-Hépatologie* 2012;7:1-9.
5. Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E3297-305.
6. Russo FP, Alison MR, Bigger BW, et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006;130:1807-21.
7. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* 2013;19:1047-53.
8. Higashiyama R, Moro T, Nakao S, et al. Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. *Gastroenterology* 2009;137:1459-66 e1.
9. Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, et al. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 2007;282:22089-101.
10. Taura K, Miura K, Iwaisako K, et al. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2010;51:1027-36.
11. Scholten D, Osterreicher CH, Scholten A, et al. Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2010;139:987-98.
12. Pinzani M. Epithelial-mesenchymal transition in chronic liver disease: fibrogenesis or escape from death? *J Hepatol* 2011;55:459-65.
13. Claperon A, Mergey M, Nguyen Ho-Bouloires TH, et al. EGF/EGFR axis contributes to the progression of cholangiocarcinoma through the induction of an epithelial-mesenchymal transition. *J Hepatol* 2014;61:325-32.
14. Kweon YO, Goodman ZD, Dienstag JL, et al. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *Journal of hepatology* 2001;35:749-55.
15. Arthur MJ. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1525-8.

16. Kent G, Gay S, Inouye T, et al. Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1976;73:3719-22.
17. Knook DL, Seffelaar AM, de Leeuw AM. Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification. *Experimental cell research* 1982;139:468-71.
18. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008;88:125-72.
19. Gaengel K, Genove G, Armulik A, et al. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009;29:630-8.
20. Yin C, Evason KJ, Maher JJ, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor, heart and neural crest derivatives expressed transcript 2, marks hepatic stellate cells in zebrafish: analysis of stellate cell entry into the developing liver. *Hepatology* 2012;56:1958-70.
21. DeLeve LD, Wang X, Guo Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology* 2008;48:920-30.
22. Xie G, Wang X, Wang L, et al. Role of differentiation of liver sinusoidal endothelial cells in progression and regression of hepatic fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2012;142:918-927 e6.
23. DeLeve LD, Wang X, Hu L, et al. Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G757-63.
24. Semela D, Das A, Langer D, et al. Platelet-derived growth factor signaling through ephrin-b2 regulates hepatic vascular structure and function. *Gastroenterology* 2008;135:671-9.
25. Lemoinne S, Cadoret A, Rautou PE, et al. Portal myofibroblasts promote vascular remodeling underlying cirrhosis formation through the release of microparticles. *Hepatology* 2014.
26. Friedman SL, Roll FJ. Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan. *Analytical biochemistry* 1987;161:207-18.
27. Housset C, Rockey DC, Bissell DM. Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90:9266-70.
28. Kinnman N, Hultcrantz R, Barbu V, et al. PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2000;80:697-707.
29. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 2007;13:1324-32.
30. Corpechot C, Barbu V, Wendum D, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002;35:1010-21.
31. Olsen AL, Bloomer SA, Chan EP, et al. Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;301:G110-8.
32. Knittel T, Kobold D, Saile B, et al. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 1999;117:1205-21.
33. Tuchweber B, Desmouliere A, Bochaton-Piallat ML, et al. Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in

- the rat. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1996;74:265-78.
34. Kinnman N, Gorla O, Wendum D, et al. Hepatic stellate cell proliferation is an early platelet-derived growth factor-mediated cellular event in rat cholestatic liver injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2001;81:1709-16.
 35. Kinnman N, Francoz C, Barbu V, et al. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2003;83:163-73.
 36. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun* 2013;4:2823.
 37. Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, et al. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *Journal of hepatology* 2002;36:200-9.
 38. Degott C, Zafrani ES, Callard P, et al. Histopathological study of primary biliary cirrhosis and the effect of ursodeoxycholic acid treatment on histology progression. *Hepatology* 1999;29:1007-12.
 39. Michalak S, Rousselet MC, Bedossa P, et al. Respective roles of porto-septal fibrosis and centrilobular fibrosis in alcoholic liver disease. *The Journal of pathology* 2003;201:55-62.
 40. Clouston AD, Powell EE, Walsh MJ, et al. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology* 2005;41:809-18.
 41. Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, et al. Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* 2007;133:80-90.
 42. Nobili V, Carpino G, Alisi A, et al. Hepatic progenitor cells activation, fibrosis, and adipokines production in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012;56:2142-53.
 43. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994;20:15-20.
 44. Li Z, Dranoff JA, Chan EP, et al. Transforming growth factor-beta and substrate stiffness regulate portal fibroblast activation in culture. *Hepatology* 2007;46:1246-56.
 45. Bosselut N, Housset C, Marcelo P, et al. Distinct proteomic features of two fibrogenic liver cell populations: hepatic stellate cells and portal myofibroblasts. *Proteomics* 2010;10:1017-28.
 46. Clouzeau-Girard H, Guyot C, Combe C, et al. Effects of bile acids on biliary epithelial cell proliferation and portal fibroblast activation using rat liver slices. *Lab Invest* 2006;86:275-85.
 47. Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, et al. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2007;87:292-303.
 48. Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Seminars in liver disease* 2010;30:258-70.
 49. Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, et al. Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2001;276:25318-23.

50. Xu R, Harrison PM, Chen M, et al. Cytoglobin overexpression protects against damage-induced fibrosis. *Mol Ther* 2006;13:1093-100.
51. Ogawa T, Tateno C, Asahina K, et al. Identification of vitamin A-free cells in a stellate cell-enriched fraction of normal rat liver as myofibroblasts. *Histochemistry and cell biology* 2007;127:161-74.
52. Dudas J, Mansuroglu T, Batusic D, et al. Thy-1 is expressed in myofibroblasts but not found in hepatic stellate cells following liver injury. *Histochemistry and cell biology* 2009;131:115-27.
53. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
54. Helisch A, Schaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation* 2003;10:83-97.
55. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298-307.
56. Medina J, Arroyo AG, Sanchez-Madrid F, et al. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology* 2004;39:1185-95.
57. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw* 2009;20:158-63.
58. Neufeld G, Kessler O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8:632-45.
59. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine* 2003;9:653-60.
60. Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell* 2009;16:196-208.
61. Stockmann C, Doedens A, Weidemann A, et al. Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature* 2008;456:814-8.
62. Lee S, Chen TT, Barber CL, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 2007;130:691-703.
63. Lanahan AA, Hermans K, Claes F, et al. VEGF receptor 2 endocytic trafficking regulates arterial morphogenesis. *Dev Cell* 2010;18:713-24.
64. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, et al. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer* 2008;8:942-56.
65. Hagberg CE, Falkevall A, Wang X, et al. Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* 2010;464:917-21.
66. Tvorogov D, Anisimov A, Zheng W, et al. Effective suppression of vascular network formation by combination of antibodies blocking VEGFR ligand binding and receptor dimerization. *Cancer Cell* 2010;18:630-40.
67. Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* 2010;140:460-76.
68. Schwartz JD, Rowinsky EK, Youssoufian H, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 in human cancer: concise review and rationale for development of IMC-18F1 (Human antibody targeting vascular endothelial growth factor receptor-1). *Cancer* 2010;116:1027-32.
69. Carmeliet P, Moons L, Lutun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7:575-83.
70. Lee HJ, Cho CH, Hwang SJ, et al. Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *FASEB J* 2004;18:1200-8.
71. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, et al. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:165-77.

72. Staton CA, Reed MW, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol* 2009;90:195-221.
73. Lawley TJ, Kubota Y. Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *J Invest Dermatol* 1989;93:59S-61S.
74. Hirschi KK, Burt JM, Hirschi KD, et al. Gap junction communication mediates transforming growth factor-beta activation and endothelial-induced mural cell differentiation. *Circulation research* 2003;93:429-37.
75. Passaniti A, Taylor RM, Pili R, et al. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 1992;67:519-28.
76. Fernandez M, Semela D, Bruix J, et al. Angiogenesis in liver disease. *Journal of hepatology* 2009;50:604-20.
77. Ross MA, Sander CM, Kleeb TB, et al. Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 2001;34:1135-48.
78. Greene AK, Wiener S, Puder M, et al. Endothelial-directed hepatic regeneration after partial hepatectomy. *Ann Surg* 2003;237:530-5.
79. Rappaport AM, MacPhee PJ, Fisher MM, et al. The scarring of the liver acini (Cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology* 1983;402:107-37.
80. Rosmorduc O, Wendum D, Corpechot C, et al. Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am J Pathol* 1999;155:1065-73.
81. Tugues S, Fernandez-Varo G, Munoz-Luque J, et al. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007;46:1919-26.
82. Taura K, De Minicis S, Seki E, et al. Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008;135:1729-38.
83. Kitade M, Yoshiji H, Kojima H, et al. Leptin-mediated neovascularization is a prerequisite for progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Hepatology* 2006;44:983-91.
84. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, et al. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 2003;52:1347-54.
85. Ehling J, Bartneck M, Wei X, et al. CCL2-dependent infiltrating macrophages promote angiogenesis in progressive liver fibrosis. *Gut* 2014.
86. Garcia-Monzon C, Sanchez-Madrid F, Garcia-Buey L, et al. Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology* 1995;108:231-41.
87. Mazzanti R, Messerini L, Monsacchi L, et al. Chronic viral hepatitis induced by hepatitis C but not hepatitis B virus infection correlates with increased liver angiogenesis. *Hepatology* 1997;25:229-34.
88. Medina J, Sanz-Cameno P, Garcia-Buey L, et al. Evidence of angiogenesis in primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical descriptive study. *J Hepatol* 2005;42:124-31.
89. Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, et al. Identification of novel molecules and pathogenic pathways in primary biliary cirrhosis: cDNA array analysis of intrahepatic differential gene expression. *Gut* 2001;49:565-76.

90. Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, et al. Insights into the pathobiology of hepatitis C virus-associated cirrhosis: analysis of intrahepatic differential gene expression. *Am J Pathol* 2002;160:641-54.
91. Kang N, Yaqoob U, Geng Z, et al. Focal adhesion assembly in myofibroblasts fosters a microenvironment that promotes tumor growth. *Am J Pathol* 2010;177:1888-900.
92. Novo E, Cannito S, Zamara E, et al. Proangiogenic cytokines as hypoxia-dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2007;170:1942-53.
93. Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, et al. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005;42:1339-48.
94. Ankoma-Sey V, Wang Y, Dai Z. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31:141-8.
95. Wang YQ, Luk JM, Ikeda K, et al. Regulatory role of vHL/HIF-1alpha in hypoxia-induced VEGF production in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;317:358-62.
96. Thabut D, Routray C, Lomberk G, et al. Complementary vascular and matrix regulatory pathways underlie the beneficial mechanism of action of sorafenib in liver fibrosis. *Hepatology* 2011;54:573-85.
97. Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *Journal of hepatology* 2010;53:976-80.
98. Iwakiri Y, Shah V, Rockey DC. Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis - Current status and future directions. *J Hepatol* 2014.
99. Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, et al. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology* 2009;49:1245-56.
100. Coriat R, Gouya H, Mir O, et al. Reversible decrease of portal venous flow in cirrhotic patients: a positive side effect of sorafenib. *PloS one* 2011;6:e16978.
101. Rodriguez-Roisin R, Krowka MJ. Hepatopulmonary syndrome--a liver-induced lung vascular disorder. *N Engl J Med* 2008;358:2378-87.
102. Chang CC, Chuang CL, Lee FY, et al. Sorafenib treatment improves hepatopulmonary syndrome in rats with biliary cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 2013;124:457-66.
103. Patsenker E, Popov Y, Stickel F, et al. Pharmacological inhibition of integrin alphavbeta3 aggravates experimental liver fibrosis and suppresses hepatic angiogenesis. *Hepatology* 2009;50:1501-11.
104. Van Steenkiste C, Ribera J, Geerts A, et al. Inhibition of placental growth factor activity reduces the severity of fibrosis, inflammation, and portal hypertension in cirrhotic mice. *Hepatology* 2011;53:1629-40.
105. Hennenberg M, Trebicka J, Kohistani Z, et al. Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in rats with established secondary biliary cirrhosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2011;91:241-51.
106. May D, Djonov V, Zamir G, et al. A transgenic model for conditional induction and rescue of portal hypertension reveals a role of VEGF-mediated regulation of sinusoidal fenestrations. *PLoS One* 2011;6:e21478.
107. Sahin H, Borkham-Kamphorst E, Kuppe C, et al. Chemokine Cxcl9 attenuates liver fibrosis-associated angiogenesis in mice. *Hepatology* 2012;55:1610-9.
108. Huang Y, Feng H, Kan T, et al. Bevacizumab attenuates hepatic fibrosis in rats by inhibiting activation of hepatic stellate cells. *PLoS One* 2013;8:e73492.

109. Gao JH, Wen SL, Yang WJ, et al. Celecoxib ameliorates portal hypertension of the cirrhotic rats through the dual inhibitory effects on the intrahepatic fibrosis and angiogenesis. *PLoS One* 2013;8:e69309.
110. Yang YY, Liu RS, Lee PC, et al. Anti-VEGFR agents ameliorate hepatic venous dysregulation/microcirculatory dysfunction, splanchnic venous pooling and ascites of NASH-cirrhotic rat. *Liver Int* 2014;34:521-34.
111. Yang L, Kwon J, Popov Y, et al. Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterology* 2014;146:1339-50 e1.
112. Novo E, Povero D, Busletta C, et al. The biphasic nature of hypoxia-induced directional migration of activated human hepatic stellate cells. *J Pathol* 2012;226:588-97.
113. Burger D, Schock S, Thompson CS, et al. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)* 2013;124:423-41.
114. van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, et al. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost* 2010;8:2596-607.
115. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2013;2.
116. Lacroix R, Judicone C, Mooberry M, et al. Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost* 2013.
117. Lemoine S, Thabut D, Housset C, et al. The emerging roles of microvesicles in liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:350-61.
118. Bernimoulin M, Waters EK, Foy M, et al. Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J Thromb Haemost* 2009;7:1019-28.
119. Leroyer AS, Rautou PE, Silvestre JS, et al. CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1302-11.
120. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010;107:1047-57.
121. Lemoine S TD, Housset C, Moreau R, Valla D, Boulanger CM, Rautou PE. Les microparticules: de nouveaux vecteurs d'information intercellulaire et des biomarqueurs potentiels dans les maladies du foie. *Hepato Gastro* 2013;20:830-838.
122. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967;13:269-88.
123. Owens AP, 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* 2011;108:1284-97.
124. Shai E, Varon D. Development, cell differentiation, angiogenesis--microparticles and their roles in angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2011;31:10-4.
125. Martinez MC, Andriantsitohaina R. Microparticles in angiogenesis: therapeutic potential. *Circulation research* 2011;109:110-9.
126. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2007;110:2432-9.
127. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 2007;110:2440-8.

128. Mause SF, Ritzel E, Liehn EA, et al. Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. *Circulation* 2010;122:495-506.
129. Benameur T, Soleti R, Porro C, et al. Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS One* 2010;5:e12688.
130. Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, et al. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation* 2009;119:2808-17.
131. Benameur T, Tual-Chalot S, Andriantsitohaina R, et al. PPARalpha is essential for microparticle-induced differentiation of mouse bone marrow-derived endothelial progenitor cells and angiogenesis. *PLoS One* 2010;5:e12392.
132. Moulin VJ, Mayrand D, Messier H, et al. Shedding of microparticles by myofibroblasts as mediator of cellular cross-talk during normal wound healing. *Journal of cellular physiology* 2010;225:734-40.
133. Chahed S, Leroyer AS, Benzerroug M, et al. Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. *Diabetes* 2010;59:694-701.
134. Soleti R, Benameur T, Porro C, et al. Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* 2009;30:580-8.
135. Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, et al. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:3794-9.
136. Ettelaie C, Su S, Li C, et al. Tissue factor-containing microparticles released from mesangial cells in response to high glucose and AGE induce tube formation in microvascular cells. *Microvasc Res* 2008;76:152-60.
137. Castellana D, Zobairi F, Martinez MC, et al. Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res* 2009;69:785-93.
138. Rautou PE, Bresson J, Sainte-Marie Y, et al. Abnormal plasma microparticles impair vasoconstrictor responses in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2012;143:166-76 e6.
139. Kornek M, Popov Y, Libermann TA, et al. Human T cell microparticles circulate in blood of hepatitis patients and induce fibrolytic activation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2011;53:230-42.
140. Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, et al. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int* 2012;82:412-27.
141. Povero D, Eguchi A, Niesman IR, et al. Lipid-induced toxicity stimulates hepatocytes to release angiogenic microparticles that require Vanin-1 for uptake by endothelial cells. *Sci Signal* 2013;6:ra88.
142. Witek RP, Yang L, Liu R, et al. Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells. *Gastroenterology* 2009;136:320-330 e2.
143. Agarwal B, Wright G, Gatt A, et al. Evaluation of coagulation abnormalities in acute liver failure. *J Hepatol* 2012;57:780-6.
144. Stravitz RT, Bowling R, Bradford RL, et al. Role of procoagulant microparticles in mediating complications and outcome of acute liver injury/acute liver failure. *Hepatology* 2013;58:304-13.

145. Thaler J, Ay C, Mackman N, et al. Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. *J Thromb Haemost* 2012;10:1363-1370.
146. Brodsky SV, Facciuto ME, Heydt D, et al. Dynamics of circulating microparticles in liver transplant patients. *J Gastrointest Liver Dis* 2008;17:261-8.
147. Ma J, Cai W, Zhang Y, et al. Innate immune cell-derived microparticles facilitate hepatocarcinoma metastasis by transferring integrin alpha(M)beta(2) to tumor cells. *J Immunol* 2013;191:3453-61.
148. Fonsato V, Collino F, Herrera MB, et al. Human liver stem cell-derived microvesicles inhibit hepatoma growth in SCID mice by delivering antitumor microRNAs. *Stem Cells* 2012;30:1985-98.
149. Flores A, Mayo MJ. Primary biliary cirrhosis in 2014. *Curr Opin Gastroenterol* 2014;30:245-52.
150. Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
151. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* 2012;56:1751-9.
152. Piscaglia F, Dudas J, Knittel T, et al. Expression of ECM proteins fibulin-1 and -2 in acute and chronic liver disease and in cultured rat liver cells. *Cell Tissue Res* 2009;337:449-62.
153. Huebert RC, Jagavelu K, Liebl AF, et al. Immortalized liver endothelial cells: a cell culture model for studies of motility and angiogenesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2010;90:1770-81.
154. Vroman B, LaRusso NF. Development and characterization of polarized primary cultures of rat intrahepatic bile duct epithelial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1996;74:303-13.
155. Fouassier L, Beaussier M, Schiffer E, et al. Hypoxia-induced changes in the expression of rat hepatobiliary transporter genes. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2007;293:G25-35.
156. Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *Journal of the American College of Cardiology* 2007;49:772-7.
157. Wahlgren J, De LKT, Brisslert M, et al. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Res* 2012;40:e130.
158. Wang Y, Huang Y, Guan F, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha and MAPK co-regulate activation of hepatic stellate cells upon hypoxia stimulation. *PLoS One* 2013;8:e74051.
159. Aoudjehane L, Pissiaia A, Jr., Scatton O, et al. Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway. *Lab Invest* 2008;88:973-85.
160. Eklund L, Piihola J, Komulainen J, et al. Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:1194-9.
161. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* 2003;3:422-33.

Annexes

Annexe 1 : Protocole d'isolement des canaux biliaires intra-hépatiques de rat

Matériel:

- 1 rat Sprague Dawley mâle d'environ 200g
- Libérase TM Research Grade (Roche®) Réf 05 401 127 001 lot 130130
- Pronase (Roche®) Réf 11 459 643 001 lot 70306722
- DNase I (Roche®) Réf 11 284 932 001 lot 12751900
- Hyaluronidase (type IV-S Sigma®) Réf H4272 lot 120M8707V
- BSA (Sigma®)
- Hépès molaire (GIBCO® Invitrogen®) Réf 15630 lot 876659
- EDTA 0,5 M pH 8 stérile (Invitrogen AMBION)
- DMEM (Sigma®) Réf D6046
- SVF (GIBCO® Invitrogen®) Réf 10270-098 lot 41G3510K
- Pénicilline-streptozocine (GIBCO® Invitrogen®) Réf 15140-122 lot 892250
- HBSS 1X sans MgCl sans CaCl₂ (GIBCO® Invitrogen®) Réf 14170-088
- HBSS 1X avec MgCl avec CaCl₂ (GIBCO® Invitrogen®) Réf 24020-091
- MEM avec Earl's sans glutamine (GIBCO® Invitrogen®) Réf 21090-022
- L15 Medium Leibovitz (Sigma®) Réf L5520
- Pentobarbital sodique (CEVA Santé Animale® 5,47g/100mL)

- Héparine sodique Choay 5000 UI/mL diluée au 1/10ème dans du serum physiologique
- 1 Bain Marie à agitation orbitale à 37°C
- 1 Bain Marie pour chauffer les solutions à 37°C
- 1 pompe péristaltique
- 1 lampe chauffante (pour placer au dessus du rat)

La veille:

1) Stériliser:

- Schotts 250mL
- instruments de chirurgie
- 1 fourchette
- tubes pour la pompe (Masterflex® Ref 96410-16)

2) Préparation du milieu de culture des cellules:

DMEM complété avec :

Hépès molaire 1%

Pénicilline-streptozocine 1%

SVF 10%

3) Préparation de la solution d'EDTA

Préparer une solution à 19mg/l:

A partir d'une solution de EDTA 0,5M pH8 (Invitrogen AMBION)

Pour 50ml de solution, mélanger:

- 6,5 ml DETA 0,5M stérile
- 43,5 ml eau stérile

Filtrer avec une seringue et un filtre stérile sous la hotte pour mettre la solution dans un tube de 50mL stérile. Conserver à 4°C.

4) Préparation de la libérase

Reconstituer la libérase avec de l'eau stérile: 10ml pour 50mg pour obtenir une concentration de 5mg/ml à aliquoter par eppendorf de 2ml (=10mg la dose nécessaire pour un isolement).

Conserver les aliquots au congélateur à -20°C.

Le jour même:

Allumer les 2 bains Marie à 37°C: le standard et l'orbital.

Décongeler la libérase dans de la glace.

1)Préparation des solutions de perfusion:

L15 +1% Hépès: 500ml L15 + 5ml Hépès molaire

Solution 1:

-EDTA(solution à 19mg/l) = 2 mL

-HBSS 1X sans MgCl₂ sans CaCl₂ = 200 mL

Solution 2:

-Libérase= 4mg à adapter au poids du rat

-HBSS 1 X avec MgCl₂ et CaCl₂ = 200 mL

2) Préparation des solutions d'incubation:

Solution A:

-Libérase =4,5mg à adapter au poids du rat

-Pronase = 140 mg

-BSA = 200 mg

-DNase = 12 mg

-SVF = 6mL

-Hépès molaire = 2 mL

-Peni-strepto = 2 mL

-MEM = 190 mL

Solution B:

- Libérase = 1,5mg à adapter au poids du rat
- Hyaluronidase = 27 mg
- BSA = 75 mg
- DNAse = 4,5mg
- Péni-strepto = 0,75 mL
- SVF = 2,25 mL
- Hépès molaire = 0,75 mL
- MEM = 71,25 mL

Corriger le pH de chaque solution pour qu'il soit entre 7,3 et 7,4 (ajout NaOH ou HCl).

Stériliser les solutions sous la hotte par passage au travers d'un filtre (0,22µm) dans des schotts stériles qui sont ensuite placés dans le bain Marie à 37°C.

3) Perfusion in situ du foie:

- Pesée du rat.
 - Anesthésie générale du rat par injection intra-péritonéale de pentobarbital 50mg/kg (injection de 1ml/100g de poids total d'une solution de pentobarbital dilué au 1/10eme)
 - Rasage abdomen et patte arrière gauche. Désinfection à la bétadine cutanée.
 - Incision abdominale.
 - Exposition de la veine porte, ligature de la veine gastro-duodénale avec un fil noir. Pose de 2 fils sur la veine porte: 2 fils blancs qui ne sont pas serrés, à la hauteur de la veine gastroduodénale
 - Exposition de la veine cave inférieure, au dessus de la veine rénale, pose d'1 fil blanc.
 - Injection intraveineuse d'héparine par la veine fémorale gauche: 1mL soit 500 UI.
 - Canuler la veine porte avec un cathlon 16G stérile, retirer l'aiguille et serrer les 2 fils blancs autour de la canule pour la maintenir en place. Brancher la tubulure de perfusion sur la canule.
- Perfusion de S1: 200ml à un débit de 10ml/min.
- Couper la veine cave inférieure en dessous du fil.

- Après ouverture de la cage thoracique, exposition de la veine cave inferieure juste au dessus de l'oreillette droite et pose d'un fil blanc autour d'elle. Canuler la veine cave avec un cathlon 16G stérile. Maintenir la canule en serrant le fil blanc autour d'elle. Brancher une tubulure sur la canule par laquelle va pouvoir s'évacuer la solution de perfusion. Serrer le noeud autour de la veine cave inferieure en dessous du foie au niveau de la veine renale droite.
- Perfusion du foie par Solution 2: 200mL à un debit de 10mL/min

4) Collecte du foie:

- Après la perfusion successive des 2 solutions, serrer un nouveau fil autour de la veine cave inférieure en dessous du cœur, pour refermer le circuit de perfusion.
- Prélever le foie total en conservant la canule dans la veine porte.
- Placer le foie dans une boite de Pétri stérile de 100 mm.
- Injecter par la canule portale de 50mL de L15 avec 1% d'Hépès molaire à 4°C
- Sous la hotte, gratter le foie avec une fourchette stérile pour libérer les hepatocytes.
- Prélever l'arbre biliaire
- Répéter l'opération dans une autre boîte de Pétri toujours avec du L15
- Mettre un peu de solution A dans une autre boîte de Pétri et y déposer l'arbre biliaire. Couper en petits morceaux avec des ciseaux.
- Transvaser le tout dans un schott de 250 mL
- Rincer la boite de Pétri avec de la solution A
- Ajuster le contenu du schott à 100 mL avec la solution A.
- Placer le schott à 37°C dans l'agitateur orbital pendant 30 minutes (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC®, Heat HIGH, Speed 4,8)
- Filtrer le contenu du schott avec un filtre de 100µm en laissant les plus gros morceaux au fond du flacon. Récupérer ce qu'il y a sur le filtre (en le lavant avec un peu de la solution A) et le remettre dans le flacon d'origine (où il reste les morceaux). Sur la poubelle, filtrer le filtrat avec un filtre de 40µm. Rincer le fond du schott à filtrer avec du L15. Récupérer ce qu'il y a sur le filtre avec la solution d'incubation A à compléter jusqu'à 100mL.
- Remettre à incuber le schott contenant les cellules dans la solution A pendant 30 minutes dans l'incubateur orbital.

- Filtrer à nouveau le contenu du schott avec un filtre de 100µm en laissant les plus gros morceaux au fond du flacon. Récupérer ce qu'il y a sur le filtre (en le lavant avec de la solution B) et le remettre dans le flacon d'origine (où il reste les morceaux). Sur la poubelle, filtrer le filtrat avec un filtre de 40µm. Rincer le fond du schott à filtrer avec du L15. Récupérer ce qu'il y a sur le filtre avec la solution d'incubation B à compléter avec la totalité de la solution B.
- Remettre à incuber le schott contenant les cellules dans la solution B pendant 30 minutes dans l'incubateur orbital.
- Filtrer le contenu du schott avec un filtre de 100µm. Jeter le filtre et son contenu. Récupérer le filtrat et le refiltrer une 2eme fois avec un filtre de 100µm. Jeter le filtre et son contenu. Récupérer le filtrat.
- Sur la poubelle, refiltrer le filtrat avec un filtre de 40µm. Récupérer ce qu'il y a sur le filtre en versant du L15 5x10mL. Refiltrer trois fois supplémentaires toujours avec un filtre de 40µm toujours en récupérant les cellules sur le filtre toujours avec 5x10mL de L15. Lors de la quatrième et dernière fois, laver le filtre avec 40ml (4x10ml) de milieu de culture complet directement sur un tube de 50ml stérile.
- Centrifuger les cellules: à 1900 RPM pendant 8 minutes à 15°C acc9/dec9.
- Resuspendre le culot dans 6ml de milieu
- Verser 1mL dans le puits d'une plaque de 12 puits.
- Observer les cellules au microscope pour juger de leur densité.
- Répartir les cellules dans les puits de boîtes de culture en adaptant la dilution à leur densité. (Boîtes de culture CORNING Incorporated®, Costar®)
- Placer les boîtes dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO2 (SANYO).

Table des Figures

Figure 1 : Schéma du lobule hépatique.	11
Figure 2 : Marquage α -sma du foie humain.	12
Figure 3 : Schéma localisant la cellule étoilée du foie	15
Figure 4: Activation myofibroblastique des CEF in vitro.	17
Figure 5 : Les étapes de l'angiogenèse.	26
Figure 6 : Technique de la chambre de pli cutané dorsal chez la souris.	35
Figure 7 : Formation et caractéristiques des vésicules extra-cellulaires.	45
Figure 8: Mécanismes d'action des microparticules	48
Figure 9 : Apparence des canaux biliaires à l'isolement et comparaison à l'isolement des CEF.	57
Figure 10 : La culture des canaux biliaires aboutit à l'apparition des myofibroblastes portaux.	58
Figure 11 : Caractérisation par PCR du modèle de MFP au cours de la culture.	60
Figure 12 : Caractérisation par immuno-fluorescence du modèle de MFP au cours de la culture.	61
Figure 13 : Expression d' α -sma par les CEF-MF et les MFP.	62
Figure 14 : Analyse du transcriptome des MFP.	63
Figure 15 : Expression de Col15a1 dans notre modèle de MFP.	65
Figure 16 : Expression du Col15a1 par les MFP et par les autres cellules du foie.	67
Figure 17 : Comparaison de Col15a1 à la fibuline-2 comme marqueur des MFP.	69
Figure 18: Modèles de fibrose hépatique chez le rat.	70

Figure 19: Les myofibroblastes portaux s'accumulent dans le foie aux stades de fibrose avancée, parallèlement à l'augmentation de l'angiogenèse.	74
Figure 20 : Distribution du marquage COL15A1 dans le foie humain sain et cirrhotique.	76
Figure 21: Localisation de cellules positives pour COL15A1 à proximité des cholangiocytes dans le foie normal.	78
Figure 22 : Analyse par cytométrie en flux d'une fraction de cellules non-parenchymateuses du foie humain, enrichie en cellules endothéliales et en cellules de Kupffer.	80
Figure 23 : Marquage du foie cirrhotique humain par COL15A1 et Fibuline-2.	81
Figure 24 : Caractérisation des LSEC primaires de rat.	83
Figure 25: Méthode de quantification du test de tubulogenèse.	85
Figure 26 : Effet de la co-culture des MFP sur la tubulogenèse endothéliale.	89
Figure 27 : Effet des MFP sur la migration des cellules endothéliales.	90
Figure 28 : Effet du milieu conditionné des MFP sur la tubulogenèse des cellules endothéliales.	91
Figure 29 : Effet du milieu conditionné des MFP sur la vascularisation des implants de Matrigel chez la souris.	92
Figure 30: Rôle des microparticules dans l'effet pro-angiogénique des MFP.	95
Figure 31: Effet de la transfection des MFP.	96
Figure 32 : Effet de l'hypoxie sur le pouvoir angiogénique des MFP.	97
Figure 33 : Effet de l'hypoxie sur l'expression des gènes de l'angiogenèse dans les MFP.	99
Figure 34 : Comparaison du pouvoir angiogénique des MFP issus de rat sham et des MFP issus de rat BDL.	101
Figure 35 : Comparaison de l'expression des gènes de l'angiogenèse entre les MFP issus de rat <i>sham</i> et les MFP issus de rat BDL.	102
Figure 36 : Comparaison du pouvoir angiogénique des MFP issus de rat Sham et des MFP issus de rat BDL.	103
Figure 37 : Comparaison de l'expression de collagène I entre les MFP issus de rat Sham et les MFP issus de rat BDL.	104
Figure 38 : Effets de la culture sur support mou.	106
Figure 39 : Stimulation des propriétés angiogéniques des MFP par les cholangiocytes.	108

Figure 40 : Effet de la stimulation des MFP par les hépatocytes.	109
Figure 41 : Modulation des propriétés pro-fibrogéniques des MFP par les cholangiocytes.	110
Figure 42 : Pouvoir pro-angiogénique des MFP.	111
Figure 43 : Contribution des MFP au remodelage vasculaire survenant lors de la progression de la fibrose hépatique.	115

Tables des tableaux

Tableau 1 : Classification de la fibrose selon le score METAVIR.	19
Tableau 2 : Marqueurs des CEF-MF et des MFP rapportés par la littérature.	21
Tableau 3 : Résultats du transcriptome.	22
Tableau 4 : Marqueurs des MFP identifiés par le transcriptome.	23
Tableau 5 : Molécules régulant l'angiogenèse.	27
Tableau 6 : Synthèse des principaux travaux ayant inhibé l'angiogenèse dans le contexte de fibrose hépatique.	41
Tableau 7: Marqueurs des vésicules extra-cellulaires.	46
Tableau 8: Méthodes d'étude des microparticules.	49
Tableau 9 : Etude des MP circulantes chez les patients atteints de maladie du foie.	52
Tableau 10 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR.	59

Articles

Ce travail de thèse a abouti à la publications de 2 revues et d'un article original :

Lemoinne S, Cadoret A, El Mourabit H, Thabut D, Housset C. Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 2013 ; 1832(7) :948-54.

Lemoinne S, Thabut D, Housset C, Moreau R, Valla D, Boulanger CM , Rautou PE. The emerging roles of microvesicles in liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014 ; 7.

Lemoinne S, Cadoret A, Rautou P-E, El Mourabit H, Ratziu V, Corpechot C, Rey C, Bosselut N, Barbu V, Wendum D, Feldmann G, Boulanger C, Henegar C, Housset C, Thabut D ; Portal myofibroblasts promote vascular remodeling underlying cirrhosis formation through the release of microparticles, *Hepatology*, 2014

1) Revue sur les myofibroblastes hépatiques

Biochimica et Biophysica Acta 1832 (2013) 948–954



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbadis



Review

Origins and functions of liver myofibroblasts[☆]

Sara Lemoine^{a,b}, Axelle Cadoret^{a,b}, Haquima El Mourabit^{a,b},
Dominique Thabut^{a,b,c}, Chantal Housset^{a,b,d,*}

^a UPMC Univ Paris 06, UMR_S 938, Paris, France

^b INSERM, U938, CdR Saint-Antoine, Paris, France

^c AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Hépatologie, Paris, France

^d AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Hépatologie, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2012

Received in revised form 22 February 2013

Accepted 23 February 2013

Available online 5 March 2013

Keywords:

Myofibroblast

Liver fibrosis

Angiogenesis

Hepatic stellate cell

Portal fibroblast

Ductular reaction

ABSTRACT

Myofibroblasts combine the matrix-producing functions of fibroblasts and the contractile properties of smooth muscle cells. They are the main effectors of fibrosis in all tissues and make a major contribution to other aspects of the wound healing response, including regeneration and angiogenesis. They display the *de novo* expression of α -smooth muscle actin. Myofibroblasts, which are absent from the normal liver, are derived from two major sources: hepatic stellate cells (HSCs) and portal mesenchymal cells in the injured liver. Reliable markers for distinguishing between the two subpopulations at the myofibroblast stage are currently lacking, but there is evidence to suggest that both myofibroblast cell types, each exposed to a particular microenvironment (e.g. hypoxia for HSC-MFs, ductular reaction for portal mesenchymal cell-derived myofibroblasts (PMFs)), expand and exert specialist functions, in scarring and inflammation for PMFs, and in vasoregulation and hepatocellular healing for HSC-MFs. Angiogenesis is a major mechanism by which myofibroblasts contribute to the progression of fibrosis in liver disease. It has been clearly demonstrated that liver fibrosis can regress, and this process involves a deactivation of myofibroblasts, although probably not to a fully quiescent phenotype. This article is part of a Special Issue entitled: Fibrosis: Translation of basic research to human disease.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Myofibroblasts are the main effectors of fibrosis in all tissues. They also make a major contribution to other aspects of the wound healing response, including regeneration, inflammation, angiogenesis, normal tissue repair after acute injury and to the stromal reaction in tumors. They combine phenotypic features of fibroblasts, such as the production of extracellular matrix, with the contractile functions of the smooth muscle cells involved in tissue architecture distortion. Myofibroblasts may be defined as cells that develop contractile force and stress fibers, *de novo*, and *in vivo* [1]. The most widely used and accessible marker of these cells is the *de novo* expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), although this is not an absolute requirement for the identification of a cell as a myofibroblast. Other markers of myofibroblasts (endosialin, P311, integrin α 11 β 1, osteopontin, periostin) have been proposed, but all were identified

in specific conditions, and it remains unclear whether they could serve as general markers [1]. The precursors of myofibroblasts have also yet to be identified. In most tissues, myofibroblasts are thought to originate from resident fibroblasts, but they may also be derived from other cell types, mostly of mesenchymal origin, such as vascular smooth muscle cells, pericytes and adipocytes. There is also evidence to suggest that myofibroblasts may be derived from circulating fibrocytes or resident epithelial cells, through epithelial-to-mesenchymal transition, although recent studies argue against a significant contribution of these mechanisms to fibrosis. In addition, resident fibroblasts are themselves heterogeneous and may even include antifibrotic subpopulations, such as lung Thy-1-expressing fibroblasts [2].

2. Origins of myofibroblasts in liver fibrosis

Myofibroblasts are absent from the normal liver, but they accumulate at sites of injury, in patients with chronic liver diseases. They are the major source of extracellular matrix constituents in the injured liver, as clearly demonstrated by clinical and experimental studies. However, although myofibroblasts appear to be necessary for the development of fibrosis, they may not be sufficient. For example, in scleroderma [1] and focal nodular hyperplasia (unpublished personal observation), the liver may contain large numbers of myofibroblastic cells without significant fibrosis. In the liver, as in

Abbreviations: α -SMA, α -smooth muscle actin; HSC, hepatic stellate cell; PMF, portal myofibroblast

[☆] This article is part of a Special Issue entitled: Fibrosis: Translation of basic research to human disease.

* Corresponding author at: Inserm UMR_S 938, Faculté de Médecine et Université Pierre et Marie Curie, Site Saint-Antoine, 27 rue Chaligny, 75571 Paris cedex 12, France. Tel.: +33 140011359; fax: +33 140011426.

E-mail address: chantal.housset@inserm.fr (C. Housset).

0925-4439/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2013.02.019>

other tissues, the origin of myofibroblasts is a matter of debate. During liver development, the septum transversum-derived mesothelium, which signals to induce hepatogenesis from the foregut endoderm, gives rise to sinusoidal pericytes, called hepatic stellate cells (HSCs), and perivascular mesenchymal cells, including portal fibroblasts, smooth muscle cells and fibroblasts around the central veins [3]. All these cells therefore have a common mesodermal origin, different from that of sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells and hepatoblasts. It is now more than 35 years since the initial demonstration by Hans Popper and coworkers that transitional cells with the morphologic characteristics of vitamin A-containing cells (i.e. HSCs) and fibroblasts, overproduce fibrillar collagen in rats with carbon tetrachloride-induced liver injury [4]. The paradigm of hepatic stellate cell (HSC) activation giving rise to myofibroblasts has since dominated the focus of research on liver fibrosis [5]. HSC was the first major cell type in the liver to be identified as a prominent source of collagen production in the injured liver [6], and to be shown to acquire a myofibroblastic phenotype in culture, with the ability to overproduce extracellular matrix, to contract and to undergo chemoattraction [7–10]. The factors and mechanisms triggering the myofibroblastic differentiation of hepatic stellate cells have been reviewed extensively elsewhere [5]. They include biological (e.g. lipopolysaccharide) [11], physicochemical (e.g. hypoxia) [12] and mechanical (e.g. substrate stiffness) [13] stimuli. There is now both *in vitro* and *in vivo* evidence for the existence of more than one origin of liver myofibroblasts. In preparations of cells isolated from the liver, HSCs are recognized by the fluorescence of their retinoid droplets under UV excitation at a wavelength of 328 nm. Culture studies have clearly demonstrated that other liver cell types, without fluorescent retinoid droplets, can give rise to myofibroblasts [14,15]. *In situ* ultrastructural studies have shown that fibroblasts reside in the portal mesenchyme and accumulate, with fibrosis, around bile ducts in bile duct-ligated rats [16], precisely in the zones in which α -SMA can be detected [15]. Moreover, immunohistochemical studies have shown that, in fibrotic human or rat liver, portal and septal myofibroblasts have expression profiles different from those of interface myofibroblasts or sinusoidally located HSCs, suggesting that at least two subpopulations of myofibroblasts – HSC-derived myofibroblasts (HSC-MFs) and portal mesenchymal cell-derived myofibroblasts (PMFs) – populate the injured liver [17]. The possible contribution of epithelial-to-mesenchymal transition to renal fibrosis *in vivo* has been challenged by studies based on genetic cell lineage tracing in mice [18]. Likewise, studies based on genetic cell fate tracking have strongly challenged the concept that either hepatocytes or cholangiocytes acquire a mesenchymal phenotype *in vivo* through epithelial-to-mesenchymal transition to produce the extracellular matrix in liver fibrosis [19–21]. A number of studies have also suggested that circulating cells from the bone marrow can function as stem cells, contributing to the liver myofibroblast population [22]. However, a recent study based on a system for the exclusive detection of bone marrow-derived collagen-producing cells, showed that bone marrow-derived cells played a limited role in collagen production during liver fibrosis [23].

3. Portal myofibroblasts

In almost all types of chronic liver disease, including biliary (i.e. primary biliary cirrhosis, biliary atresia), viral, alcoholic and non-alcoholic fatty liver diseases, fibrosis develops predominantly in the portal area and appears to progress from this area, even if the primary targets of injury are intralobular hepatocytes [24–28]. This observation suggests that the contribution of PMFs to liver fibrosis may be more important than generally assumed. Furthermore, in chronic liver diseases of various origins, including viral hepatitis and non-alcoholic fatty liver disease, fibrogenesis is associated with the

occurrence of a ductular reaction, in which duct-like cells with progenitor features proliferate, expanding outwards from the portal area. The correlation between the extents of the ductular reaction and of replicative senescence in hepatocytes suggests that ductular/progenitor cells may be recruited in situations in which the regeneration of mature hepatocytes is impaired. One possible explanation for this is that ductular/oval cells are less sensitive to TGF- β -induced growth inhibition than hepatocytes [29]. Several potential mechanisms by which cholangiocytes or hepatic progenitor cells may promote fibrogenesis (Fig. 1) have been reviewed elsewhere [30] and new mechanisms have recently been put forward. Ductular/progenitor cells may act on matrix accumulation directly, through the release of tissue inhibitor metalloproteinase 1 (TIMP1), for example [31]. They may act on myofibroblasts by releasing promitogenic, profibrogenic, chemotactic or anti-apoptotic factors. Hepatic progenitor cells have been shown to increase hepatic fibrogenesis, in an experimental model in which rat liver fibrosis is induced by chronic treatment with a combination of carbon tetrachloride and acetylaminofluorene, promoting activation of the hepatic progenitor cell compartment [32]. Chronic treatment with carbon tetrachloride alone caused liver fibrosis, which began around the central veins, eventually extending to form incomplete centro-central septa with sparse fibrogenic cells expressing α -smooth muscle actin. In acetylaminofluorene/carbon tetrachloride-treated animals, the fibrogenic response was strongly amplified and an expansion of the subpopulation of hepatic progenitor cells expressing transforming growth factor- β (TGF- β) was observed. In this model, hepatic progenitor cells, through their production of TGF- β , contributed to the accumulation of α -SMA-positive myofibroblasts in the ductular reaction, enhancing fibrosis but also leading to disease progression and a pattern of fibrosis similar to that observed in humans. Furthermore, ductular cells produce much more α v β 6 integrin than normal cholangiocytes. This molecule is closely linked to periductular fibrogenesis, through the activation of TGF- β [33]. Ductular cells secrete growth arrest-specific protein 6 (Gas6), which protects myofibroblasts against apoptosis [34]. A role for the hedgehog pathway in the interaction between ductular cells and portal myofibroblasts was also recently highlighted. Both cell types produce hedgehog ligands, thereby enhancing each other's viability and proliferation, and the activation of this pathway in mice amplifies both the ductular and fibrogenic responses triggered by bile duct ligation [35]. Notch signaling is essential to the development of tubular epithelial cells in the kidney, and activation of this pathway in tubular cells has been implicated in renal fibrosis [36]. Notch signaling is also essential in biliary differentiation and has recently been shown to be activated in rat experimental liver fibrosis. In this context, high levels of Notch3, Jagged1 (a Notch ligand) and Hes1 (a downstream target gene) were observed and the blocking of Notch signaling activation by a γ -secretase inhibitor significantly attenuated portal fibrosis [37]. In Alagille syndrome, a disease caused by genetic defects of Notch signaling and characterized by severe ductopenia, reactive ductular cells and hepatic progenitor cells are very rare and liver fibrosis is much less severe than in biliary atresia, a disease in which an intense ductular reaction is associated with rapid progression to biliary cirrhosis [38]. The importance of the Notch pathway in liver fibrosis has also been demonstrated in double-heterozygous mice haploinsufficient for both Jagged1 and another gene (Lunatic) altering ligand–receptor affinity. In this model, intense ductular proliferation contrasted with low levels of fibrosis [39]. Finally, hepatic progenitor cells have been shown to produce adipokines. In pediatric non-alcoholic fatty liver disease, the degree of fibrosis is related to the production of resistin [28], an adipokine with proinflammatory effects on HSCs [40] and hepatic progenitor cells.

No reliable markers have yet been identified for distinguishing between HSCs and portal mesenchymal cells at the myofibroblast stage. We have established a culture model for PMFs obtained by outgrowth from rat bile duct preparations [15]. These cells have several features in common with rat liver myofibroblasts [14,41]

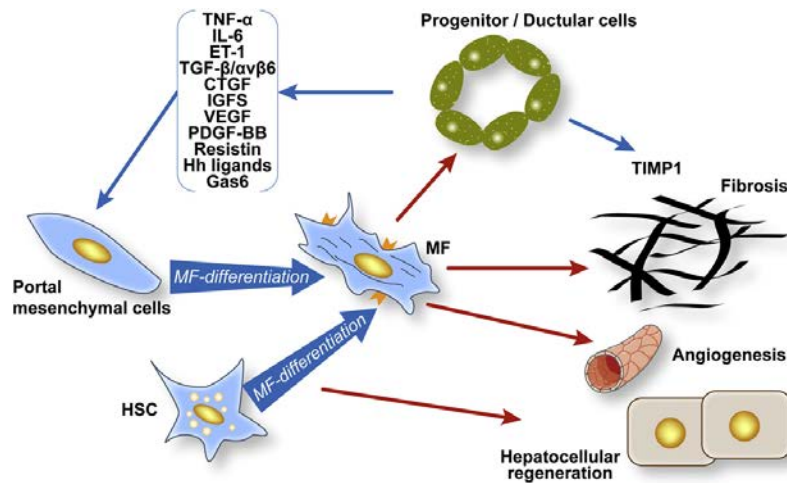


Fig. 1. Interaction of ductular/hepatic progenitor cells with liver myofibroblasts in wound healing. Ductular/hepatic progenitor cells bidirectionally interact with myofibroblasts, through multiple pathways, to proliferate and trigger profibrogenic, proangiogenic and/or proregenerative actions, depending on their origin and microenvironment.

and with portal fibroblasts in culture [41] obtained by other isolation procedures, and can be distinguished from HSC-MFs on the basis of morphological criteria and growth behavior. Their myofibroblastic differentiation requires TGF- β and mechanical tension [41], and can be triggered by PDGF-BB [41] or bile acids [42]. Following isolation from normal rat liver and culture in the same conditions, HSC-MFs are round, with an enlarged cytoplasm and poor survival after three or four passages, whereas PMFs tend to be more elongated, with more stress fibers, and proliferate more strongly during multiple passages [43]. Desmin production is differentially regulated, being upregulated during activation in HSCs and shut down in portal fibroblasts. Staining for desmin might therefore be useful for distinguishing between the two cell populations at the myofibroblast stage [15,16,41,44]. In two models of cholestatic liver injury induced by bile duct ligation and hepatic arterial deprivation, fibrosis involves myofibroblasts that are predominantly desmin-negative and, thus, presumably, of portal origin [45]. In these models, HSCs undergo massive early phenotypic changes, marked by increases in proliferation and desmin overproduction [44,45], but only a minority of these cells are converted into matrix-producing myofibroblasts, which, after prolonged injury, appear to circumscribe wounded hepatocytes to form micronodules [45].

We investigated the relative contributions of PMFs and HSC-MFs to various aspects of the liver wound-healing response, by comparing these two cell populations at similar stages of myofibroblastic differentiation (*i.e.* with similar levels of α -SMA) in culture, by comparative 2-DE MS/MS proteomic analysis [43]. We identified proteins displaying differential expression, all with myofibroblast-related functions, in PMFs. Phospho-cofilin, a small actin-binding protein that accumulates during myofibroblast differentiation and promotes stress fiber formation and collagen contraction, was the protein for which the difference in levels was the greatest. Most of the proteins overproduced in HSC-MFs were involved in stress responses, relating to hypoxic stress in particular, in keeping with the interplay known to occur between interlobular hypoxia, angiogenesis and fibrogenesis in the liver [46]. The protein displaying the highest level of overproduction in these cells was cytoglobin, which is also known as stellate cell activation-associated protein (STAP), a hypoxia-inducible hexacoordinated globin with reactive oxygen species (ROS)-scavenging properties. In HSCs, cytoglobin is

upregulated during myofibroblastic differentiation [43,47] and protects against oxidative stress and fibrosis [48]. In this analysis, we identified new potential markers in addition to those previously identified as distinguishing between the two myofibroblastic cell populations (*e.g.* fibulin 2 and Thy-1 cell surface antigen in PMFs; reelin, cytoglobin, α 2-macroglobin, mannan-binding lectin serine peptidase 1 (MASP-1), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and retinol-binding protein (RBP) in HSC-MFs (Table 1)). Overall these and other ongoing studies suggest that both myofibroblastic cell types, each exposed to a particular microenvironment (hypoxia for HSC-MFs, ductular reaction for PMFs), expand and carry out specialist functions, in scarring and inflammation for PMFs, and in vasoregulation and hepatocellular healing for HSC-MFs.

4. Myofibroblasts in liver angiogenesis

Liver injury causes vascular disorganization and local tissue hypoxia, which begins early in the course of disease [46]. Soon after the induction of injury and long before the onset of cirrhosis hypoxia-induced VEGF expression occurs, triggering angiogenesis, in various experimental models [12,49,50]. An oxygen gradient is established by unidirectional blood flow from the portal vein and hepatic artery to the central vein. Consequently, the periportal area is less likely to undergo extreme oxygen deprivation than intralobular areas. Interestingly, in a proteomic comparison of the two cell types, we found that genes encoding proteins involved in the response to hypoxia, such as cytoglobin, were more strongly expressed in HSC-MFs than in PMFs. It has been suggested that HSC-MFs contribute to angiogenesis at the leading edge of fibrotic septa [51].

Angiogenesis leads to the formation of new blood vessels from pre-existing vessels. In chronic liver diseases, angiogenesis has several major consequences: it contributes to portal hypertension [52,53], aggravates fibrosis [52,54–56] and promotes tumorigenesis (review in [46]). The role of liver myofibroblasts in angiogenesis has been documented in the contexts of both cancer and fibrosis. Research on the angiogenic functions of myofibroblasts has, to date, focused on HSCs, but our personal unpublished data indicate that portal mesenchymal cells also develop these functions. HSCs act as liver pericytes for sinusoidal endothelial cells [5,57]. The two cell types are found in close proximity and interactions between them

may be crucial for their development and function. The use of a transgenic zebrafish model, in which HSCs were identified by the presence of a basic helix–loop–helix transcription factor, revealed that sinusoidal cells were required for the correct localization of HSCs during development [58]. As mature liver pericytes, HSCs have direct, physical interactions with endothelial cells and regulate vascular development, stabilization, maturation and remodeling. HSCs have been shown to develop focal adhesions (involving Ena/VASP proteins), which promote angiogenesis [59]. HSCs also establish paracrine interactions with endothelial cells. Once their differentiation into myofibroblasts has been activated during fibrogenesis, they secrete proangiogenic cytokines: VEGF [12,49,51,60–62] and angiopoietin-1 [56,63] (Fig. 2). They also produce PDGF, a profibrogenic factor that also induces a proangiogenic phenotype in HSCs [64]. PDGF induces angiopoietin production in HSCs [63]. Leptin, a circulating peptide hormone produced by the adipose tissue, has also been shown to induce the production of VEGF and angiopoietin-1 in HSCs *in vitro* [60]. Intercellular communication may also occur through the release of microparticles, which are transported in the bloodstream to act on distant cells. HSCs can secrete microparticles containing Hedgehog ligands able to modulate gene expression in endothelial cells [65]. Another important way in which myofibroblasts promote angiogenesis is the generation of hypoxia, through the production and deposition of extracellular matrix. Hypoxia induces the HIF-dependent expression of VEGF in hepatocytes and of VEGF, angiopoietin-1 and their respective receptors in HSCs [51].

Newly formed blood vessels can supply tissues with proinflammatory cytokines from the local and systemic circulation. These cytokines maintain chronic inflammation in the liver, leading to fibrosis. This fibrosis leads to angiogenesis, which in turn causes more fibrosis, thereby establishing a vicious circle. Angiogenesis can also lead to an increase in interstitial fluid flow, because newly formed vessels may be leaky before their stabilization. This interstitial fluid flow induces myofibroblast differentiation [66]. Finally, endothelial cells from newly formed vessels may have paracrine effects on myofibroblasts (see Fig. 2). Changes of endothelial cells during angiogenesis may disrupt the subtle balance between endothelial cells and pericytes. For instance, differentiated sinusoidal endothelial cells promote the reversion of HSCs to a quiescent state, whereas capillarized sinusoidal endothelial cells do not [67]. Proangiogenic cytokines also have profibrogenic effects on myofibroblasts. The HSC migration induced by hypoxia is mediated by VEGF [68]. VEGF increases proliferation, extracellular matrix deposition and migration in HSCs [12,51,55,62,69]. The exposure of HSCs to placenta growth factor activates the ERK pathway, and increases migration,

proliferation and cytoskeleton remodeling [70]. Neuropilin-1 (VEGF co-receptor) increases HSC migration [71].

5. Myofibroblasts in liver regeneration

Liver regeneration induced by partial hepatectomy, a model of normal liver tissue repair, is associated with myofibroblastic changes of HSCs, including the loss of vitamin A content and the upregulation of markers such as α -SMA, IL-6 and hepatocyte growth factor [72]. This suggests that HSCs undergoing myofibroblastic differentiation are involved in a regenerative response. Myofibroblastic HSCs can support hepatocellular regeneration through the release of mitogens, such as hepatocyte growth factor, pleiotrophin or epimorphin, and induction of the delta-like 1 homolog [73]. It has also been shown that *Foxf1* (a mesenchyme-specific transcription factor) haploinsufficiency in mice, caused a defect in the myofibroblastic differentiation of HSCs, resulting in abnormal liver regeneration [74]. However, HSCs have also been reported to be negative regulators of hepatocyte regeneration. In one study, this negative regulatory function was attributed to stimulation of the 5-hydroxytryptamine 2B receptor on HSCs by serotonin, which activates the expression of TGF- β 1, a powerful suppressor of hepatocyte proliferation [75]. In another study, HSC depletion was achieved in ganciclovir-treated transgenic mice expressing the herpes simplex virus-thymidine kinase gene driven by the mouse GFAP promoter. HSC depletion was associated with a marked attenuation of fibrosis and liver injury, in the carbon tetrachloride and bile duct ligation models, suggesting that activated HSCs amplified liver damage [76]. Hepatocellular stellate cell crosstalk can also drive progression in hepatocellular carcinoma, by generating a permissive inflammatory and proangiogenic microenvironment, in particular [77]. Liver myofibroblasts, probably of portal origin, interact with the ductular/progenitor cells to promote their survival and proliferation via the hedgehog pathway [35] and loss of the ectonucleotidase NTPDase2, an antiproliferative factor expressed in normal fibroblasts [78]. Production of the Notch ligand Jagged 1 by myofibroblasts promotes the biliary specification of hepatic progenitor cells, directing their differentiation into cholangiocytes [79]. Myofibroblast-derived PDGF-BB also promotes survival signaling in cholangiocarcinoma cells [80].

6. Deactivation of liver myofibroblasts

The deactivation of myofibroblasts is critical for the termination of the reparative response and the restoration of normal tissue structure. It is generally assumed that terminally differentiated myofibroblasts undergo apoptosis when fibrosis regresses. Indeed, some myofibroblasts have been observed to undergo apoptosis [81] or senescence [82] during the regression of liver fibrosis. In myofibroblasts derived from human lung fibroblast cells continuously stimulated with serum, α -SMA levels have been shown to decrease with increasing cell proliferation [83]. These changes, interpreted as dedifferentiation, are associated with the downregulation of MyoD, a basic helix–loop–helix transcription factor with a critical function in myogenic differentiation and in TGF- β 1-induced myofibroblast differentiation [83]. It has been shown, with a hydrogel system, that the substrate modulus of valvular myofibroblasts can be decreased, leading to their deactivation and decreases in the levels of α -SMA stress fibers and proliferation, these cells then being redirected to become dormant fibroblasts [84]. Likewise, changes in substrate stiffness have been shown to induce a reversion of the myofibroblastic phenotype in human liver myofibroblasts [85]. Culture studies have suggested that myofibroblastic HSCs may revert to a more quiescent phenotype, characterized by the loss of fibrogenic genes and the expression of adipogenic genes [86]. The cre-loxP-based genetic labeling of myofibroblasts has been used to show that, during recovery from carbon tetrachloride or alcohol-induced liver fibrosis, myofibroblastic stellate cells may revert to an inactive, although not entirely quiescent phenotype, with the capacity

Table 1
Previously published proposed markers of hepatic stellate cell-derived myofibroblasts (HSC-MFs) and portal myofibroblasts (PMFs).

	Name (references)
HSC-MFs	Reelin [91]
	Cytoglobin [43]
	α -2-macroglobulin [14]
	Desmin [14]
	Vascular cell adhesion molecule 1 [14]
	Mannan-binding lectin serine peptidase [14]
	Glial fibrillary acidic protein [14,17]
	Pirin (iron-binding nuclear protein) [43]
	Protein disulfide isomerase family A, member 4 [43]
	Neural cell adhesion molecule 1 [14,17]
	Retinol binding protein 1, cellular [92]
	Fibulin 2 [14]
	Thy-1 cell surface antigen [93]
	Fibronectin 1 [14]
N CAM [17]	
PMFs	Gremlin [93,94]
	Heat shock protein 1 [43]
	Latexin [43]
	Cofilin 1, non-muscle [43]

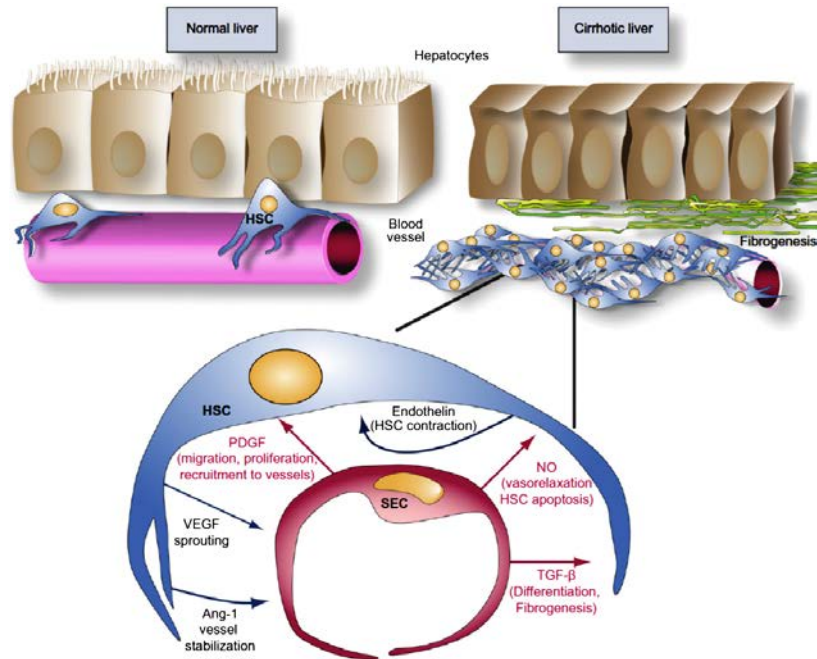


Fig. 2. Myofibroblastic changes of hepatic stellate cells related to sinusoidal remodeling and angiogenesis in the fibrotic liver. In the fibrotic liver, an increasing number of HSCs wrap around sinusoids, thereby contributing to the formation of a high-resistance, constricted sinusoidal vessel. At the cellular level, a number of soluble factors are involved in this process, through autocrine and paracrine signaling between HSC-MFs and sinusoidal endothelial cells. Reproduced with permission from Thabut & Shah, *J Hepatol* 2010 [95].

to undergo rapid reactivation to regenerate myofibroblasts [87]. In another study, the authors used single-cell PCR and genetic cell fate tracking to show that about half the HSCs were deactivated, with decreases in α -SMA and collagen I levels, after the cessation of carbon tetrachloride treatment in mice. The deactivated HSCs obtained in this model were also more responsive to profibrogenic stimulation than fully quiescent HSCs [88]. In patients with chronic hepatitis C and a sustained virological response (SVR), the analysis of paired pre- and post-treatment liver biopsies showed that treatment led to the regression of cirrhosis and a decrease in collagen content in most cases. Ductular proliferation also decreased, but sinusoidal capillarization persisted, as assessed by analyses of CD34 and α -SMA, suggesting that the deactivation of HSCs was only partial [89]. However, in this study, α -SMA levels either remained unchanged or increased, despite the regression of fibrosis, suggesting that myofibroblastic differentiation may be irreversible once it has progressed beyond a certain stage. Alternatively, it may depend on the microenvironment, a scenario supported by the fact that activated HSCs revert to quiescence when cocultured with differentiated sinusoidal endothelial cells, but not with capillarized cells [67]. In addition, the fate of portal myofibroblasts needs to be addressed, to clarify the mechanisms underlying fibrosis progression. The triggering of myofibroblast apoptosis by pharmacological [90] or genetic [87] approaches could potentially improve treatment, by causing fibrosis regression. Partial reversion of the myofibroblastic phenotype may also lead to a favorable outcome, but a potential threat remains in cases of subsequent injury. Complete reversion to a quiescent phenotype is clearly the ultimate goal of treatment, but it may be possible to achieve such reversion only in the early stages of disease.

7. Conclusions

At least two populations of liver myofibroblasts, derived from portal mesenchymal cells and hepatic stellate cells, accumulate in the injured liver. We propose a model of liver tissue repair, in which both myofibroblastic populations, each exposed to a different microenvironment, expand and carry out specialist functions, in scarring for PMFs and hepatocellular healing for HSC-MFs. These specific features should be taken into account in the development of antifibrotic drugs, to ensure the targeting of collagen cross-linking or of fully differentiated myofibroblasts, rather than stages of myofibroblastic differentiation, which may be beneficial for the regeneration of liver epithelial cells. Strategies for restoring the normal, quiescent phenotype of myofibroblast precursors should also be considered.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the FRM (*Fondation pour la Recherche Médicale*), the *Fonds Cholangite Sclérosante Primitive (CSP)*, the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under agreement no. HEALTH-F2-2009-241762 for the FLIP (Fatty Liver Inhibition of Progression) project and the AFEF (*Association Française pour l'Etude du Foie*). We thank Yves Chrétien, CdR Saint-Antoine, for figure design and Julie Sappa of Alex Edelman & Associates for revising our English usage in this manuscript.

References

- [1] B. Hinz, S.H. Phan, V.J. Thannickal, M. Prunotto, A. Desmouliere, J. Varga, O. De Wever, M. Mareel, G. Gabbiani, Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling, *Am. J. Pathol.* 180 (2012) 1340–1355.
- [2] Y. Zhou, J.S. Hagood, B. Lu, W.D. Merryman, J.E. Murphy-Ullrich, Thy-1-integrin α 5 interactions inhibit lung fibroblast contraction-induced latent transforming growth factor- β 1 activation and myofibroblast differentiation, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 22382–22393.
- [3] K. Asahina, B. Zhou, W.T. Pu, H. Tsukamoto, Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver, *Hepatology* 53 (2011) 983–995.
- [4] G. Kent, S. Gay, T. Inouye, R. Bahu, O.T. Minick, H. Popper, Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73 (1976) 3719–3722.
- [5] S.L. Friedman, Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 125–172.
- [6] J.J. Maher, R.F. McGuire, Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis *in vivo*, *J. Clin. Invest.* 86 (1990) 1641–1648.
- [7] D.L. Knook, A.M. Seffelaar, A.M. de Leeuw, Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification, *Exp. Cell Res.* 139 (1982) 468–471.
- [8] S.L. Friedman, F.J. Roll, Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan, *Anal. Biochem.* 161 (1987) 207–218.
- [9] C. Housset, D.C. Rockey, D.M. Bissell, Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 9266–9270.
- [10] N. Kinnman, R. Hultcrantz, V. Barbu, C. Rey, D. Wendum, R. Poupon, C. Housset, PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury, *Lab. Invest.* 80 (2000) 697–707.
- [11] E. Seki, S. De Minicis, C.H. Osterreicher, J. Kluewe, Y. Osawa, D.A. Brenner, R.F. Schwabe, TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis, *Nat. Med.* 13 (2007) 1324–1332.
- [12] C. Corpechot, V. Barbu, D. Wendum, N. Kinnman, C. Rey, R. Poupon, C. Housset, O. Rosmorduc, Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis, *Hepatology* 35 (2002) 1010–1021.
- [13] A.L. Olsen, S.A. Bloomer, E.P. Chan, M.D. Gaca, P.C. Georges, B. Sackey, M. Uemura, P.A. Janmey, R.G. Wells, Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301 (2011) G110–G118.
- [14] T. Knittel, D. Kobold, B. Saile, A. Grundmann, K. Neubauer, F. Piscaglia, G. Ramadori, Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential, *Gastroenterology* 117 (1999) 1205–1221.
- [15] N. Kinnman, C. Francoz, V. Barbu, D. Wendum, C. Rey, R. Hultcrantz, R. Poupon, C. Housset, The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis, *Lab. Invest.* 83 (2003) 163–173.
- [16] B. Tuchweber, A. Desmouliere, M.L. Bochaton-Piallat, L. Rubbia-Brandt, G. Gabbiani, Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat, *Lab. Invest.* 74 (1996) 265–278.
- [17] D. Cassiman, L. Libbrecht, V. Desmet, C. Denef, T. Roskams, Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers, *J. Hepatol.* 36 (2002) 200–209.
- [18] B.D. Humphreys, S.L. Lin, A. Kobayashi, T.E. Hudson, B.T. Nowlin, J.V. Bonventre, M.T. Valerius, A.P. McMahon, J.S. Duffield, Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis, *Am. J. Pathol.* 176 (2010) 85–97.
- [19] K. Taura, K. Miura, K. Iwasako, C.H. Osterreicher, Y. Kodama, M. Penz-Osterreicher, D.A. Brenner, Hepatocytes do not undergo epithelial–mesenchymal transition in liver fibrosis in mice, *Hepatology* 51 (2010) 1027–1036.
- [20] D. Scholten, C.H. Osterreicher, A. Scholten, K. Iwasako, G. Gu, D.A. Brenner, T. Kisseleva, Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice, *Gastroenterology* 139 (2010) 987–998.
- [21] M. Pinzani, Epithelial–mesenchymal transition in chronic liver disease: fibrogenesis or escape from death? *J. Hepatol.* 55 (2011) 459–465.
- [22] F.P. Russo, M.R. Alison, B.W. Bigger, E. Amofah, A. Florou, F. Amin, G. Bou-Gharios, R. Jeffery, J.P. Iredale, S.J. Forbes, The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis, *Gastroenterology* 130 (2006) 1807–1821.
- [23] R. Higashiyama, T. Moro, S. Nakao, K. Mikami, H. Fukumitsu, Y. Ueda, K. Ikeda, E. Adachi, C. Bou-Gharios, I. Okazaki, Y. Inagaki, Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice, *Gastroenterology* 137 (2009) 1459–1466, (e1451).
- [24] C. Degott, E.S. Zafrani, P. Callard, B. Balkau, R.E. Poupon, R. Poupon, Histopathological study of primary biliary cirrhosis and the effect of ursodeoxycholic acid treatment on histology progression, *Hepatology* 29 (1999) 1007–1012.
- [25] S. Michalak, M.C. Rousselet, P. Bedossa, C. Pilette, D. Chappard, F. Oberti, Y. Gallois, P. Cales, Respective roles of porto-septal fibrosis and centrilobular fibrosis in alcoholic liver disease, *J. Pathol.* 201 (2003) 55–62.
- [26] A.D. Clouston, E.E. Powell, M.J. Walsh, M.M. Richardson, A.J. Demetris, J.R. Jonsson, Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis, *Hepatology* 41 (2005) 809–818.
- [27] M.M. Richardson, J.R. Jonsson, E.E. Powell, E.M. Brunt, B.A. Neuschwander-Tetri, P.S. Bhathal, J.B. Dixon, M.D. Weltman, H. Tilg, A.R. Moschen, D.M. Purdie, A.J. Demetris, A.D. Clouston, Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction, *Gastroenterology* 133 (2007) 80–90.
- [28] V. Nobili, G. Carpino, A. Alisi, A. Franchitto, G. Alpini, R. De Vito, P. Onori, D. Alvaro, E. Gaudio, Hepatic progenitor cells activation, fibrosis, and adipokine production in pediatric nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology* 56 (2012) 2142–2153.
- [29] L.N. Nguyen, M.H. Furuya, L.A. Wolfraim, A.P. Nguyen, M.S. Holdren, J.S. Campbell, B. Knight, G.C. Yeoh, N. Fausto, W.T. Parks, Transforming growth factor- β 4 differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation, *Hepatology* 45 (2007) 31–41.
- [30] N. Kinnman, C. Housset, Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis, *Front. Biosci.* 7 (2002) d496–d503.
- [31] T. Pham Van, D. Couchie, N. Martin-Garcia, Y. Laperche, E.S. Zafrani, P. Mavrier, Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in liver regeneration from oval cells in rat, *Matrix Biol.* 27 (2008) 674–681.
- [32] M.N. Chobert, D. Couchie, A. Fourcot, E.S. Zafrani, Y. Laperche, P. Mavrier, A. Brouillet, Liver precursor cells increase hepatic fibrosis induced by chronic carbon tetrachloride intoxication in rats, *Lab. Invest.* 92 (2012) 135–150.
- [33] B. Wang, B.M. Dolinski, N. Kikuchi, D.R. Leone, M.G. Peters, P.H. Weinreb, S.M. Violette, D.M. Bissell, Role of α 5 β 1 integrin in acute biliary fibrosis, *Hepatology* 46 (2007) 1404–1412.
- [34] A. Fourcot, D. Couchie, M.N. Chobert, E.S. Zafrani, P. Mavrier, Y. Laperche, A. Brouillet, Gas6 deficiency prevents liver inflammation, steatohepatitis, and fibrosis in mice, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300 (2011) G1043–G1053.
- [35] A. Omenetti, L. Yang, Y.X. Li, S.J. McCall, Y. Jung, J.K. Sicklick, J. Huang, S. Choi, A. Suzuki, A.M. Diehl, Hedgehog-mediated mesenchymal–epithelial interactions modulate hepatic response to bile duct ligation, *Lab. Invest.* 87 (2007) 499–514.
- [36] B. Bielez, Y. Sirin, H. Si, T. Niranjan, A. Gruenwald, S. Ahn, H. Kato, J. Pullman, M. Gessler, V.H. Haase, K. Susztak, Epithelial Notch signaling regulates interstitial fibrosis development in the kidneys of mice and humans, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 4040–4054.
- [37] Y. Chen, S. Zheng, D. Qi, J. Guo, S. Zhang, Z. Weng, Inhibition of Notch signaling by a gamma-secretase inhibitor attenuates hepatic fibrosis in rats, *PLoS One* 7 (2012) e46512.
- [38] L. Fabris, M. Cadamuro, M. Guido, C. Spirli, R. Fiorotto, M. Colledan, G. Torre, D. Alberti, A. Sonzogni, L. Okolicsanyi, M. Strazzabosco, Analysis of liver repair mechanisms in Alagille syndrome and biliary atresia reveals a role for notch signaling, *Am. J. Pathol.* 171 (2007) 641–653.
- [39] M.J. Ryan, C. Bales, A. Nelson, D.M. Gonzalez, L. Underkoffler, M. Segalov, J. Wilson-Rawls, S.E. Cole, J.L. Moran, P. Russo, N.B. Spinner, K. Kusumi, K.M. Loomes, Bile duct proliferation in Jag1/fringe heterozygous mice identifies candidate modifiers of the Alagille syndrome hepatic phenotype, *Hepatology* 48 (2008) 1989–1997.
- [40] C. Bertolani, P. Sancho-Bru, P. Faili, R. Bataller, S. Aleffi, R. DeFranco, B. Mazzinghi, P. Romagnani, S. Milani, P. Gines, J. Colmenero, M. Parola, S. Gelmini, R. Tarquini, C. Laffi, M. Pinzani, F. Marra, Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells, *Am. J. Pathol.* 169 (2006) 2042–2053.
- [41] Z. Li, J.A. Dranoff, E.P. Chan, M. Uemura, J. Sevigny, R.G. Wells, Transforming growth factor- β and substrate stiffness regulate portal fibroblast activation in culture, *Hepatology* 46 (2007) 1246–1256.
- [42] H. Clouzeau-Girard, C. Guyot, C. Combe, V. Moronville-Halley, C. Housset, T. Lamireau, J. Rosenbaum, A. Desmouliere, Effects of bile acids on biliary epithelial cell proliferation and portal fibroblast activation using rat liver slices, *Lab. Invest.* 86 (2006) 275–285.
- [43] N. Bosselut, C. Housset, P. Marcelo, C. Rey, T. Burmester, J. Vinh, M. Vaubourdel, A. Cadoret, B. Baudin, Distinct proteomic features of two fibrogenic liver cell populations: hepatic stellate cells and portal myofibroblasts, *Proteomics* 10 (2010) 1017–1028.
- [44] N. Kinnman, O. Goria, D. Wendum, M.C. Gendron, C. Rey, R. Poupon, C. Housset, Hepatic stellate cell proliferation is an early platelet-derived growth factor-mediated cellular event in rat cholestatic liver injury, *Lab. Invest.* 81 (2001) 1709–1716.
- [45] M. Beaussier, D. Wendum, E. Schiffer, S. Dumont, C. Rey, A. Lienhart, C. Housset, Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries, *Lab. Invest.* 87 (2007) 292–303.
- [46] O. Rosmorduc, C. Housset, Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease, *Semin. Liver Dis.* 30 (2010) 258–270.
- [47] N. Kawada, D.B. Kristensen, K. Asahina, K. Nakatani, Y. Minamiyama, S. Seki, K. Yoshizato, Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 25318–25323.
- [48] R. Xu, P.M. Harrison, M. Chen, L. Li, T.Y. Tsui, P.C. Fung, P.T. Cheung, G. Wang, H. Li, Y. Diao, G.W. Krissansen, S. Xu, F. Farzaneh, Cytoglobin overexpression protects against damage-induced fibrosis, *Mol. Ther.* 13 (2006) 1093–1100.
- [49] O. Rosmorduc, D. Wendum, C. Corpechot, B. Galy, N. Sebbagh, J. Raleigh, C. Housset, R. Poupon, Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis, *Am. J. Pathol.* 155 (1999) 1065–1073.
- [50] C. Corpechot, V. Barbu, D. Wendum, N. Chignard, C. Housset, R. Poupon, O. Rosmorduc, Hepatocyte growth factor and c-Met inhibition by hepatic cell hypoxia: a potential mechanism for liver regeneration failure in experimental cirrhosis, *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 613–620.
- [51] E. Novo, S. Cannito, E. Zamara, L. Valfre di Bonzo, A. Caligiuri, C. Cravanzola, A. Compagnone, S. Colombatto, F. Marra, M. Pinzani, M. Parola, Proangiogenic

- cytokines as hypoxia-dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells, *Am. J. Pathol.* 170 (2007) 1942–1953.
- [52] M. Mejias, E. Garcia-Pras, C. Tiani, R. Miquel, J. Bosch, M. Fernandez, Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats, *Hepatology* 49 (2009) 1245–1256.
- [53] R. Coriat, H. Gouya, O. Mir, S. Ropert, O. Vignaux, S. Chaussade, P. Sogni, S. Pol, B. Blanchet, P. Legmann, F. Goldwasser, Reversible decrease of portal venous flow in cirrhotic patients: a positive side effect of sorafenib, *PLoS One* 6 (2011) e16978.
- [54] S. Tugues, G. Fernandez-Varo, J. Munoz-Luque, J. Ros, V. Arroyo, J. Rodes, S.L. Friedman, P. Carmeliet, W. Jimenez, M. Morales-Ruiz, Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats, *Hepatology* 46 (2007) 1919–1926.
- [55] H. Yoshiji, S. Kuriyama, J. Yoshii, Y. Ikenaka, R. Noguchi, D.J. Hicklin, Y. Wu, K. Yanase, T. Namiaki, M. Yamazaki, H. Tsujinoue, H. Imazu, T. Masaki, H. Fukui, Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis, *Gut* 52 (2003) 1347–1354.
- [56] K. Taura, S. De Minicis, E. Seki, E. Hatano, K. Iwaisako, C.H. Osterreicher, Y. Kodama, K. Miura, I. Imai, S. Uemoto, D.A. Brenner, Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis, *Gastroenterology* 135 (2008) 1729–1738.
- [57] J.S. Lee, D. Semela, J. Iredale, V.H. Shah, Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology* 45 (2007) 817–825.
- [58] C. Yin, K.J. Evason, J.J. Maher, D.Y. Stainier, The basic helix–loop–helix transcription factor, heart and neural crest derivatives expressed Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease, *Nat. Med.* 18 (2012) 572–579.
- [59] N. Kang, U. Yaqoob, Z. Geng, K. Bloch, C. Liu, T. Gomez, D. Billadeau, V. Shah, Focal adhesion assembly in myofibroblasts fosters a microenvironment that promotes tumor growth, *Am. J. Pathol.* 177 (2010) 1888–1900.
- [60] S. Aleffi, I. Petrai, C. Bertolani, M. Parola, S. Colombatto, E. Novo, F. Vizzutti, F.A. Anania, S. Milani, K. Rombouts, G. Laffi, M. Pinzani, F. Marra, Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells, *Hepatology* 42 (2005) 1339–1348.
- [61] V. Ankoma-Sey, Y. Wang, Z. Dai, Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells, *Hepatology* 31 (2000) 141–148.
- [62] Y.Q. Wang, J.M. Luk, K. Ikeda, K. Man, A.C. Chu, K. Kaneda, S.T. Fan, Regulatory role of vHL/HIF-1 α in hypoxia-induced VEGF production in hepatic stellate cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317 (2004) 358–362.
- [63] D. Thabut, C. Routray, G. Lomber, U. Shergill, K. Glaser, R. Huebert, L. Patel, T. Masuyk, B. Blechacz, A. Vercocke, E. Ritman, R. Ehma, R. Urrutia, V. Shah, Complementary vascular and matrix regulatory pathways underlie the beneficial mechanism of action of sorafenib in liver fibrosis, *Hepatology* 54 (2011) 573–585.
- [64] D. Semela, A. Das, D. Langer, N. Kang, E. Leof, V. Shah, Platelet-derived growth factor signaling through Ephrin-b2 regulates hepatic vascular structure and function, *Gastroenterology* 135 (2008) 671–679.
- [65] R.P. Witek, L. Yang, R. Liu, Y. Jung, A. Omenetti, W.K. Syn, S.S. Choi, Y. Cheong, C.M. Fearing, K.M. Agboola, W. Chen, A.M. Diehl, Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells, *Gastroenterology* 136 (2009) 320–330, (e322).
- [66] C.P. Ng, B. Hinz, M.A. Swartz, Interstitial fluid flow induces myofibroblast differentiation and collagen alignment *in vitro*, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 4731–4739.
- [67] L.D. Deleve, X. Wang, Y. Guo, Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence, *Hepatology* 48 (2008) 920–930.
- [68] E. Novo, D. Povero, C. Busletta, C. Paternostro, L.V. di Bonzo, S. Cannito, A. Compagnone, A. Bandino, F. Marra, S. Colombatto, E. David, M. Pinzani, M. Parola, The biphasic nature of hypoxia-induced directional migration of activated human hepatic stellate cells, *J. Pathol.* 226 (2012) 588–597.
- [69] E. Olaso, C. Salado, E. Egilegor, V. Gutierrez, A. Santisteban, P. Sancho-Bru, S.L. Friedman, F. Vidal-Vanaclocha, Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis, *Hepatology* 37 (2003) 674–685.
- [70] C. Van Steenkiste, J. Ribera, A. Geerts, M. Pauta, S. Tugues, C. Casteleyn, L. Libbrecht, K. Olievier, B. Schroyen, H. Reynaert, L.A. van Grunsven, B. Blomme, S. Coulon, F. Heindryckx, M. De Vos, J.M. Stassen, S. Vinckier, J. Altamirano, R. Bataller, P. Carmeliet, H. Van Vlierberghe, I. Colle, M. Morales-Ruiz, Inhibition of placental growth factor activity reduces the severity of fibrosis, inflammation, and portal hypertension in cirrhotic mice, *Hepatology* 53 (2011) 1629–1640.
- [71] S. Cao, U. Yaqoob, A. Das, U. Shergill, K. Jagavelu, R.C. Huebert, C. Routray, S. Abdelmoneim, M. Vasdev, E. Leof, M. Charlton, R.J. Watts, D. Mukhopadhyay, V.H. Shah, Neuregulin-1 promotes cirrhosis of the rodent and human liver by enhancing PDGF/TGF- β signaling in hepatic stellate cells, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 2379–2394.
- [72] K. Asai, S. Tamakawa, M. Yamamoto, M. Yoshie, Y. Tokusashi, Y. Yaginuma, S. Kasai, K. Ogawa, Activated hepatic stellate cells overexpress p75NTR after partial hepatectomy and undergo apoptosis on nerve growth factor stimulation, *Liver Int.* 26 (2006) 595–603.
- [73] N.L. Zhu, K. Asahina, J. Wang, A. Ueno, R. Lazaro, Y. Miyaoka, A. Miyajima, H. Tsukamoto, Hepatic stellate cell-derived delta-like homolog 1 (DLK1) protein in liver regeneration, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 10355–10367.
- [74] V.V. Kalinichenko, D. Bhattacharyya, Y. Zhou, G.A. Gusarova, W. Kim, B. Shin, R.H. Costa, Foxf1^{+/+} mice exhibit defective stellate cell activation and abnormal liver regeneration following CCl₄ injury, *Hepatology* 37 (2003) 107–117.
- [75] M.R. Ebrahimkhani, F. Oakley, L.B. Murphy, J. Mann, A. Moles, M.J. Perugorria, E. Ellis, A.F. Lakey, A.D. Burt, A. Douglass, M.C. Wright, S.A. White, F. Jaffre, L. Maroteaux, D.A. Mann, Stimulating healthy tissue regeneration by targeting the 5-HT(2)B receptor in chronic liver disease, *Nat. Med.* 17 (2011) 1668–1673.
- [76] J.E. Puche, Y.A. Lee, J. Jiao, C. Aloman, M.I. Fiel, U. Munoz, T. Kraus, T. Lee, H.F. Yee Jr., S.L. Friedman, A novel murine model to deplete hepatic stellate cells uncovers their role in amplifying liver damage, *Hepatology* 57 (2012) 339–350.
- [77] C. Coulouarn, A. Corlu, D. Glaise, I. Guenon, S.S. Thorgeirsson, B. Clement, Hepatocyte-stellate cell cross-talk in the liver engenders a permissive inflammatory microenvironment that drives progression in hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.* 72 (2012) 2533–2542.
- [78] M.N. Jhandier, E.A. Kruglov, E.G. Lavoie, J. Sevigny, J.A. Dranoff, Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 22986–22992.
- [79] L. Boulter, O. Govaere, T.G. Bird, S. Radulescu, P. Ramachandran, A. Pellicoro, R.A. Ridgway, S.S. Seo, B. Spee, N. Van Rooijen, O.J. Sansom, J.P. Iredale, S. Lowell, T. Roskams, S.J. Forbes, Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease, *Nat. Med.* 18 (2012) 572–579.
- [80] C.D. Fingas, S.F. Bronk, N.W. Werneburg, J.L. Mott, M.E. Guicciardi, S.C. Cazanave, J.C. Mertens, A.E. Sirica, G.J. Gores, Myofibroblast-derived PDGF- β B promotes hedgehog survival signaling in cholangiocarcinoma cells, *Hepatology* 54 (2011) 2076–2088.
- [81] J.P. Iredale, R.C. Benyon, J. Pickering, M. McCullen, M. Northrop, S. Pawley, C. Howell, M.J. Arthur, Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors, *J. Clin. Invest.* 102 (1998) 538–549.
- [82] V. Krizhanovsky, M. Yon, R.A. Dickins, S. Hearn, J. Simon, C. Miething, H. Yee, L. Zender, S.W. Lowe, Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis, *Cell* 134 (2008) 657–667.
- [83] L. Hecker, R. Jagirdar, T. Jin, V.J. Thannickal, Reversible differentiation of myofibroblasts by MyoD, *Exp. Cell Res.* 317 (2011) 1914–1921.
- [84] H. Wang, S.M. Haeger, A.M. Kloxin, L.A. Leinwand, K.S. Anseth, Redirecting valvular myofibroblasts into dormant fibroblasts through light-mediated reduction in substrate modulus, *PLoS One* 7 (2012) e39969.
- [85] N. Sohara, I. Znoyko, M.T. Levy, M. Trojanowska, A. Reuben, Reversal of activation of human myofibroblast-like cells by culture on a basement membrane-like substrate, *J. Hepatol.* 37 (2002) 214–221.
- [86] H. She, S. Xiong, S. Hazra, H. Tsukamoto, Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 4959–4967.
- [87] T. Kisseleva, M. Cong, Y. Paik, D. Scholten, C. Jiang, C. Benner, K. Iwaisako, T. Moore-Morris, B. Scott, H. Tsukamoto, S.M. Evans, W. Dillmann, C.K. Glass, D.A. Brenner, Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 9448–9453.
- [88] J.S. Troeger, I. Mederacke, G.Y. Gwak, D.H. Dapito, X. Mu, C.C. Hsu, J.P. Pradere, R.A. Friedman, R.F. Schwabe, Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice, *Gastroenterology* 143 (2012) 1073–1083, (e1022).
- [89] R. D'Ambrosio, A. Aghemo, M.G. Rumi, G. Ronchi, M.F. Donato, V. Paradis, M. Colombo, P. Bedossa, A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis, *Hepatology* 56 (2012) 532–543.
- [90] M.C. Wright, R. Issa, D.E. Smart, N. Trim, G.I. Murray, J.N. Primrose, M.J. Arthur, J.P. Iredale, D.A. Mann, Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats, *Gastroenterology* 121 (2001) 685–698.
- [91] D. Kobold, A. Grundmann, F. Piscaglia, C. Eisenbach, K. Neubauer, J. Steffgen, G. Ramadori, T. Knittel, Expression of reelin in hepatic stellate cells and during hepatic tissue repair: a novel marker for the differentiation of HSC from other liver myofibroblasts, *J. Hepatol.* 36 (2002) 607–613.
- [92] S. Lepreux, P. Bioulac-Sage, G. Gabbiani, V. Sapin, C. Housset, J. Rosenbaum, C. Balabaud, A. Desmouliere, Cellular retinol-binding protein-1 expression in normal and fibrotic/cirrhotic human liver: different patterns of expression in hepatic stellate cells and (myo)fibroblast subpopulations, *J. Hepatol.* 40 (2004) 774–780.
- [93] J. Dudas, T. Mansuroglu, D. Batusic, G. Ramadori, Thy-1 is expressed in myofibroblasts but not found in hepatic stellate cells following liver injury, *Histochem. Cell Biol.* 131 (2009) 115–127.
- [94] T. Ogawa, C. Tateno, K. Asahina, H. Fujii, N. Kawada, M. Obara, K. Yoshizato, Identification of vitamin A-free cells in a stellate cell-enriched fraction of normal rat liver as myofibroblasts, *Histochem. Cell Biol.* 127 (2007) 161–174.
- [95] D. Thabut, V. Shah, Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J. Hepatol.* 53 (2010) 976–980.

The emerging roles of microvesicles in liver diseases

Sara Lemoine, Dominique Thabut, Chantal Housset, Richard Moreau, Dominique Valla, Chantal M. Boulanger and Pierre-Emmanuel Rautou

Abstract | Microvesicles (MVs) are extracellular vesicles released by virtually all cells, under both physiological and pathological conditions. They contain lipids, proteins, RNAs and microRNAs and act as vectors of information that regulate the function of target cells. This Review provides an overview of the studies assessing circulating MV levels in patients with liver diseases, together with an insight into the mechanisms that could account for these changes. We also present a detailed analysis of the implication of MVs in key processes of liver diseases. MVs have a dual role in fibrosis as certain types of MVs promote fibrolysis by increasing expression of matrix metalloproteinases, whereas others promote fibrosis by stimulating processes such as angiogenesis. MVs probably enhance portal hypertension by contributing to intrahepatic vasoconstriction, splanchnic vasodilation and angiogenesis. As MVs can modulate vascular permeability, vascular tone and angiogenesis, they might contribute to several complications of cirrhosis including hepatic encephalopathy, hepatopulmonary syndrome and hepatorenal syndrome. Several results also suggest that MVs have a role in hepatocellular carcinoma. Although MVs represent promising biomarkers in patients with liver disease, methods of isolation and subsequent analysis must be standardized.

Lemoine, S. et al. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* advance online publication 4 February 2014; doi:10.1038/nrgastro.2014.7

Introduction

Microvesicles (MVs) are part of a group of extracellular vesicles that also includes exosomes and apoptotic bodies. Schematically, these three different types of vesicles have been defined by their size, mechanisms of production, and protein and lipid content. The main features of these extracellular vesicles are shown in Figure 1 and Box 1, although caution is required, as the precise definition of each type of extracellular vesicle is still a matter of debate.^{1,2} Moreover, owing to a lack of standardization of the isolation procedures and of the detection methods, a strict separation of these vesicles (in particular MVs and exosomes) has not been achieved in several studies. As limited specific data on apoptotic bodies and exosomes in liver diseases exist, this Review is focused on MVs, taking into account the above mentioned limitations.

Although MVs were previously considered to be cellular debris, they are now recognized as vectors for intercellular information exchange. MVs—also referred to as microparticles or ectosomes—usually refer to vesicles 0.1–1 µm in diameter produced by budding from the plasma membrane. Another classic, but still debated, feature of MVs is the exposure of phosphatidylserine at their surface, which can be detected by labelling of annexin V or lactadherin using flow cytometry analysis.³ Moreover, as MVs harbour most of the

membrane-associated proteins of the cells they stem from, their cellular origin can be determined using flow cytometry using antibodies against specific cell-surface markers (Box 1). MVs also contain lipids, cytosolic proteins, RNAs and/or microRNAs, and regulate the function of the target cell. MVs can interact with their target cells in a variety of ways: release of the soluble mediators they contain; ligand–receptor interactions; fusion of MV membranes with those of the target cell and transfer of MV contents (especially RNAs and microRNAs); or phagocytosis/endocytosis by macrophages or endothelial cells.^{4,5} The lipid, protein and nucleic acid fractions contained in MVs vary greatly depending upon the cell of origin and the stimulus initiating MV release.⁶ Their diverse content translates into different downstream effects; for example, MVs isolated from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial cell proliferation, whereas circulating MVs from the same patients do not.⁷ As a result, although the information obtained using MVs generated *in vitro* provides important information regarding the mechanisms of these vectors, application of these results *in vivo* must still be elucidated. Thus, this Review pays particular attention to studies evaluating the effects of MVs isolated from patients or from animal models.

MVs are now implicated in several major fields of hepatology. This Review describes studies assessing circulating MV levels in patients with liver diseases, together with insights into the mechanisms that could

INSERM, UMRS 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie Paris 6, 27 Rue Chaligny, 75571 Paris, France (S. Lemoine, D. Thabut, C. Housset). INSERM, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon CRB3, Université Paris-Diderot-Paris 7, Hôpital Bichat, 46 Rue Henri Huchard, 75018 Paris, France (R. Moreau). Service d'hépatologie, Hôpital Beaujon, 100 Boulevard du Général Leclerc, 92100 Clichy, France (D. Valla). INSERM, U970, Paris Cardiovasculaire Research Center, Paris, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 56 Rue Leblanc, 75015 Paris, France (C. M. Boulanger, P.-E. Rautou).

Correspondence to: P.-E. Rautou pierre-emmanuel.rautou@inserm.fr

Competing interests

The authors declare no competing interests.

REVIEWS

Key points

- Microvesicles (MVs) are 0.1–1.0 μm vesicles containing lipids, proteins, RNAs and microRNAs; they are formed by budding from the cellular plasma membrane
- Circulating levels of several subpopulations of MVs are increased in patients with liver diseases, probably due to enhanced MV production and decreased MV clearance, related to the individual liver disorder
- MVs are now implicated at many stages of liver disease progression, including liver fibrogenesis, portal hypertension and activation of coagulation
- Several results suggest that MVs have a role in hepatocellular carcinoma by conveying information between tumour cells and between tumour and neighbouring cells
- High levels of circulating procoagulant MVs have been found in patients with acute liver failure and might contribute to normal or hypercoagulable global haemostasis in this setting
- MVs have promise as diagnostic and prognostic biomarkers in patients with liver diseases

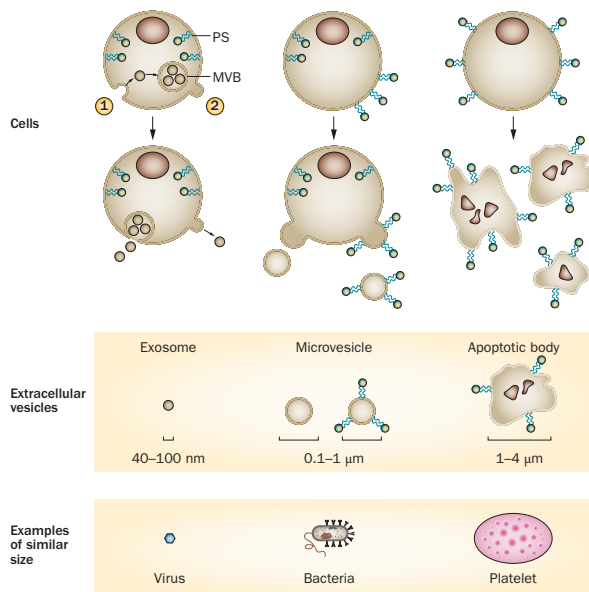


Figure 1 | Definitions of microvesicles. Left: Exosomes. Cells release exosomes via two mechanisms. In the classic pathway (1), intracellular vesicles appear from inward membrane budding and form MVBs before fusing with the PM and being released into the extracellular space. The direct pathway (2) involves the release of vesicles, indistinguishable from exosomes, directly from the PM without involvement of MVBs. Exosomes expose little or no PS at their surface, but harbour relatively specific markers. Middle: Microvesicles. Under normal conditions, PS is primarily located on the PM inner leaflet. After exposure to a stimulus, PS is exposed at the cell surface and cytoskeleton reorganization occurs leading to outward blebbing of the PM and release of MVs into extracellular space. However, formation of MVs might happen without externalization of PS as some MVs might be PS negative. Right: Apoptotic bodies. The early stages of apoptosis are characterized by changes in mitochondrial membrane potential and PM asymmetry leading to exposure of PS at the cell surface, but without increased cell permeability. Later stages of apoptosis are characterized by DNA fragmentation and increased PM permeability. Apoptotic cells shrink and can break up into smaller apoptotic bodies. Like MVs, apoptotic bodies harbour PS and contain various materials from mother cells (PM markers, proteins, RNA and microRNA). Unlike MVs, they contain nuclear fragments. Abbreviations: MV, microvesicle; MVB, multivesicular body; PM, plasma membrane; PS, phosphatidylserine.

Box 1 | Proposed markers of extracellular vesicles*

Exosomes

Alix, CD9, CD63, CD81, heat shock proteins, TSG101

Microvesicles

Phosphatidylserine (detected using annexin V or lactadherin)

Cell type marker

- Leukocyte: CD45, CD11a, CD11b
- Granulocyte: CD66b
- Monocyte: CD14
- Lymphocyte: CD4⁺ and CD8⁺ T cells, CD20 (B cell)
- Platelet: CD41a, CD42a, CD42b, CD31⁺/CD42⁺, CD61, CD62b, CD62p
- Erythrocyte: CD235a
- Endothelial cell: CD31⁺/CD41⁻, CD62e, CD51, CD105, CD144, CD146

Apoptotic bodies

Phosphatidylserine and/or DNA (detected using annexin V or propidium iodide), histones, DNA

*These markers are largely used and the best identified so far, although none of them can be considered as 100% specific. Abbreviation: TSG, tumour susceptibility gene.

account for these changes. The potential roles of MVs in key processes of liver diseases, such as fibrosis, portal hypertension, complications of cirrhosis, thrombosis and hepatocellular carcinoma, are also presented. If specific studies in the context of liver diseases are lacking, we postulate on the potential effects of MVs on the basis of available data from other organs. Finally, we interpret available results and propose clinical situations in which MVs could be useful as biomarkers.

Increased MV levels in liver diseases

MVs have been detected in numerous human body fluids, including saliva,⁸ urine,⁹ bile,¹⁰ synovial fluid,¹¹ vitreous fluid¹² and semen,¹³ as well as in muscles,¹⁴ atherosclerotic plaques⁷ and liver tissue¹⁵ (Figure 2a). Nevertheless, most studies have focused on plasma MVs, because they are easily accessible. Circulating levels of MVs are increased in patients with cardiovascular disorders, thrombosis and cancer.^{16–18} Over the past ~10 years, several groups have measured the levels of circulating MVs in patients with liver diseases (Table 1).^{19–30} The increased levels of several subpopulations of circulating MVs reported in these studies are a result of increased formation and/or decreased clearance of MVs (Figure 2b; Box 2).

Enhanced MV formation

Several causes of liver disease trigger MV production, in particular alcohol consumption,³¹ viral infection³² and features of the metabolic syndrome including diabetes,³³ obesity,³⁴ dyslipidaemia³⁵ and physical inactivity.³⁶ Liver disease itself might also induce MV release, as the main processes of MV formation (namely, apoptosis and cell activation) are common in this context.^{37,38} Furthermore, many stimuli that promote MV release, including oxidative stress,³⁹ shear stress,^{40,41} systemic inflammation and bacterial translocation, are present in liver diseases (Table 2).^{10,39,42–49}

Decrease in MV clearance

The mechanisms of MV clearance have been reviewed elsewhere.⁵ Under healthy conditions, spleen and liver macrophages are the primary contributors to MV clearance from the circulation.^{5,50,51} Interestingly, several lines of evidence show that cirrhosis is associated with a defect in macrophage function. Indeed, the function of the macrophage Fc gamma receptor is impaired in patients with alcoholic cirrhosis and is correlated with the degree of liver insufficiency.⁵² Similarly, macrophage dysfunction has been observed in animal models of cirrhosis⁵³ and the clearance of certain molecules (radio-labelled colloid or microaggregated human serum albumin) has been shown to be decreased in patients with cirrhosis.^{54,55} As such, we speculate that clearance of MVs might also be decreased in these patients. During pathological conditions that are associated with elevated levels of circulating MVs, such as endotoxaemia, another pathway for MV clearance is 'turned on' in the liver and lung endothelium.⁵⁶ As cirrhosis is associated with detectable endotoxaemia,⁴² it would be interesting to determine whether this pathway is activated or defective in cirrhosis. In healthy individuals, platelets are the major source of MVs; the reason why platelet-derived MVs are not systematically increased in patients with cirrhosis is unclear.^{21,24}

MVs and liver fibrosis

MVs and fibrolysis

MVs have been suggested to promote the regression of fibrosis in the liver.²² Indeed, circulating levels of T-cell MVs are elevated in patients with active hepatitis C compared with patients with mild hepatitis C and healthy controls. MVs released *in vitro* from T cells fused with hepatic stellate cell (HSC) membranes, leading to an upregulation of matrix metalloproteinases *MMP1*, *MMP3*, *MMP9* and *MMP13* gene expression; down-regulation of the gene encoding procollagen- $\alpha 1(I)$; and blunting of profibrogenic activities of transforming growth factor $\beta 1$ (Figure 3). Although zymography was not performed to confirm these results, the induced fibrolytic activity seemed evident with MVs from activated CD4⁺ T cells and even higher with MVs from activated and apoptotic CD8⁺ T cells. Basigin (also known as CD147 and EMMPRIN) exposed on T-cell MVs contributed to the induction of HSC fibrolytic activity.²² These results are in-line with previous reports showing that MVs generated *in vitro* from T cells and monocytes strongly induce synthesis of matrix metalloproteinases in fibroblasts.⁵⁷ MVs also carry proteases themselves, as reported for MVs generated *in vitro* from endothelial cells and neutrophils under static conditions.^{58,59} It should be highlighted that all these results have been obtained using MVs generated *in vitro* and tested on cultured cells (Box 3).

Although not yet investigated in the context of liver diseases, indirect evidence indicates that MVs could also promote fibrolysis via the microRNAs they contain.⁶⁰ MicroRNAs are short noncoding RNAs that bind to messenger RNAs to regulate gene expression.⁶¹

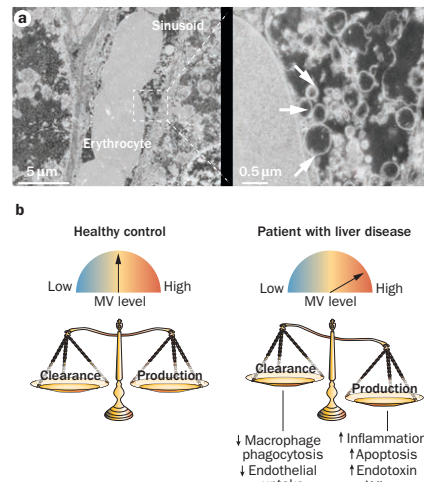


Figure 2 | Microvesicles in liver diseases. **a** | Transmission electron microscopy image of a liver biopsy performed in a patient with chronic HCV infection. Within sinusoids, erythrocytes can be seen. Insert: presence of vesicles (white arrows) of MV size. **b** | In a healthy individual, the formation and clearance of MVs are balanced whereas in a patient with a liver disease, MV formation is likely enhanced and MV clearance decreased. This imbalance leads to an increase in the levels of several MV subpopulations in patients with liver diseases. Abbreviation: MV, microvesicle.

Circulating microRNAs are transported by MVs, as well as by exosomes, lipoproteins and ribonucleoprotein complexes (such as Argonaute 2), which protect them from rapid degradation by plasma RNAses. A quantitative analysis published in 2012 of circulating microRNAs in patients with coronary artery disease showed that the majority of plasma microRNAs are associated with MVs.⁶² The profiles of microRNAs in MVs were found to be markedly different from those in their maternal cells, indicating an active mechanism of selective MV 'packaging'.⁶² Interestingly, MVs released from cultured endothelial progenitor cells *in vitro* prevented tubulointerstitial fibrosis and preserved renal function 180 days after injection into a rat model of ischaemia-reperfusion injury.⁶³ Several convincing experiments have revealed that the protective effect of these MVs is based on the microRNAs (specifically miR-126 and miR-296) they contain.⁶³ Other microRNAs also contribute to the regression of fibrosis in the liver, as reviewed elsewhere.⁶⁰ It has not yet been determined if these microRNAs are also harboured by MVs.

MVs and fibrogenesis

Although data show that MVs mitigate liver fibrosis, the process seems to be complex (Figure 3). Angiogenesis is proposed to promote fibrogenesis in the liver and hepatic fibrosis usually decreases when angiogenesis is pharmacologically inhibited.⁶⁴ Angiogenesis is increased by

Table 1 | Circulating MVs in patients with liver diseases

Liver disease (number of patients)	Method	Analysed subpopulations of MVs	Potential interest of MVs as a biomarker	Reference
Hepatitis B (n=11) Hepatitis C (n=25)	FCM	Platelets	Marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C	Fusegawa <i>et al.</i> (2002) ¹⁹
Hepatitis C (n=16) HCC (n=8)	FCM	Annexin V-positive, endothelial, hepatocyte	Marker of HCC and post-transplantation outcome	Brodsky <i>et al.</i> (2008) ²⁰
Hepatitis B and C related cirrhosis (n=60)	FCM	Platelets	ND	Sayed <i>et al.</i> (2010) ²¹
Hepatitis C (n=21)	FCM	Annexin V-positive, lymphocyte, macrophages, neutrophils, platelets	Marker of liver inflammation and fibrosis	Kornek <i>et al.</i> (2011) ²²
Alcoholic liver disease (n=20) Hepatitis C related cirrhosis (n=9)	FCM	Platelets	ND	Ogasawara <i>et al.</i> (2005) ²³
Hepatitis C (n=20) Alcoholic cirrhosis (n=71)	FCM	Annexin V-positive, leukoendothelial, lymphocyte, platelets, hepatocyte, erythrocyte	Marker of cirrhosis severity	Rautou <i>et al.</i> (2012) ²⁴
NAFLD (n=67) Hepatitis C (n=42)	FCM	Annexin V-positive, lymphocytes, natural killer T cells or macrophage, neutrophils, platelets	Marker of liver inflammation	Kornek <i>et al.</i> (2012) ²⁵
Liver transplantation (n=19)	FCM	Platelets	Marker of ischaemia-reperfusion injury	Esch <i>et al.</i> (2010) ²⁶
Acute liver failure (n=20)	MV PS activity assay	PS-positive	ND	Agarwal <i>et al.</i> (2012) ²⁷
Acute liver failure with (n=20) and without (n=20) kidney injury	MV PS activity assay	PS-positive	ND	Agarwal <i>et al.</i> (2013) ²⁸
Acute liver failure (n=50)	FCM; ISADE™; MV tissue factor activity	Annexin V-positive, endothelial, hepatocyte, monocytes, platelet, tissue-factor-positive	Prognostic marker	Stravitz <i>et al.</i> (2013) ²⁹
Acute liver failure (n=5) Acute-on-chronic liver failure (n=5)	FCM	Hematopoietic stem cells	Marker of acute liver insults	Schmelze <i>et al.</i> (2013) ³⁰

Abbreviations: FCM, flow cytometry; HCC, hepatocellular carcinoma; ISADE™, Invitro sizing, antigen detection and enumeration (Invitro, NC, USA); MV, microvesicle; ND, not determined; PS, phosphatidylserine.

MVs generated *in vitro* from platelets,⁶⁵ lymphocytes,⁶⁶ or endothelial progenitor cells,⁶⁷ and by those obtained from mouse ischaemic hind-limb muscles.¹⁴ The pro-angiogenic effect of MVs suggests that they promote fibrogenesis, a hypothesis supported by data from Feldstein and colleagues who observed that hepatocytes exposed to saturated, but not monounsaturated, free fatty acids released MVs *in vitro* that induced marked angiogenesis both *in vitro* and *in vivo*, in a manner dependent on the ectoenzyme pantetheinase (also known as vanin-1).⁴⁹ Vanin-1 is found primarily in the liver, kidney epithelia and intestine, and has been linked with promotion of cell adherence and migration.⁴⁹ In a common mouse model of dietary-induced steatohepatitis, this group detected high levels of hepatocyte-derived MVs associated with marked angiogenesis and early liver fibrosis. Genetic inhibition of caspase-3 limited the increase in circulating hepatocyte-derived MVs and protected mice from angiogenesis and fibrosis, independent of lipid accumulation and inflammation.⁴⁹ Although these results are not direct, they suggest that hepatocyte-derived MVs contribute to angiogenesis and liver fibrosis in steatohepatitis.

HSCs are the main precursor of liver myofibroblasts and have a key role in fibrosis.⁶⁸ A pioneer study by Diehl and colleagues showed that cultured HSCs

release MVs that expose Hedgehog ligands on their surface. These ligands induce the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by primary sinusoidal endothelial cells *in vitro*;¹⁰ MVs isolated from the plasma or bile of bile-duct-ligated rats also have a similar effect.¹⁰ iNOS expression in the liver increases in cirrhosis,⁶⁹ and iNOS-deficient mice have less fibrosis after chronic carbon tetrachloride administration than wild-type mice,⁷⁰ supporting a profibrogenic role for iNOS. Therefore, HSC MVs might enhance fibrogenesis by inducing iNOS expression.¹⁰ Finally, as discussed in a later section, MVs have procoagulant properties.^{71,72} Results from various studies suggest that coagulation activation promotes liver fibrosis⁷³ and, as such, MVs might also promote fibrogenesis.

In conclusion, the overall effect of MVs on liver fibrosis is still unclear and dedicated studies in animal models are required to fully elucidate their role. However, such studies are hampered by the short half-life of MVs in the circulation precluding assessment of their long-term effects,⁵ and by the lack of genetically modified mice that are deficient in MV formation without other marked defects. An acceptable option would be to use daily injections of diannexin, an annexin V homodimer that cloaks phosphatidylserine residues on the surfaces of MVs and acts as an inhibitor of MVs.⁷⁴

Box 2 | Challenges in assessing microvesicles in the portal vein

Analysis of the levels and cell origin of microvesicles (MVs) present in the portal and hepatic veins would provide some insight into the role of the liver in MV clearance and production. However, obtaining such blood samples suitable for MV analysis is complex in patients, as well as in animal models.

In patients, portal blood can be obtained during transhepatic intravenous portosystemic shunt (TIPS) placement or revision, or during abdominal surgery. TIPS placement is associated with liver injury that immediately activates blood coagulation and thus induces a strong release of MVs. Extrapolating results obtained from portal vein blood at the time of TIPS revision to what happens in patients without TIPS would also be hazardous because of the systemic changes associated with TIPS. Besides ethical considerations, data obtained using blood drawn from the portal vein at the time of a surgery should be interpreted cautiously, as the reason for such a surgery is usually a digestive tract disease, which can also induce MV release.

Concerns have also been raised about the use of mouse models. In particular, we observed that circulating levels of annexin V-containing MVs are much lower in rats with carbon-tetrachloride-induced cirrhosis than in controls injected with the vehicle only (Rautou, P.-E. and Boulanger, C. M., unpublished data), which is not what has been reported in patients with cirrhosis (Table 1). These low MV levels probably result from the high phospholipase A2 activity induced by carbon tetrachloride. Indeed, phospholipase A2 is able to hydrolyze phospholipids, such as phosphatidylserine or phosphatidylcholine, exposed at the surface of MVs. Bile duct ligation seems to be a good chronic liver disease model to study MVs (Rautou, P.-E. and Mackman, N., unpublished data). Yet, drawing blood from the portal vein of bile-duct-ligated animals without activating coagulation, that is, by using a sufficiently large needle, is tricky.

MVs and portal hypertension**MVs and intrahepatic vascular resistance**

Portal hypertension is a frequent and severe complication of cirrhosis, a leading cause of death and an indication for liver transplantation. The pathogenesis of portal hypertension is mainly related to a combination of structural and dynamic components that cause an increase in hepatic vascular resistance to portal blood flow.⁷⁵ The structural components include fibrosis, regenerative nodule formation and vascular remodelling. The potential role of MVs in liver fibrosis has already been discussed. MVs might also contribute to vascular remodelling in cirrhosis through the release of MVs expressing Hedgehog ligands from HSCs. These MVs induce changes in sinusoidal endothelial cell gene expression *in vitro*, presumably contributing to their

activation and to sinusoidal remodelling.¹⁰ Portal myofibroblasts also release MVs that stimulate angiogenesis both *in vitro* and in mice, in a VEGF-dependent manner, thus enhancing vascular remodelling.⁷⁶

The dynamic components of portal hypertension include increased hepatic vascular tone, related to elevated activity of several endogenous vasoconstrictors, and reduced bioavailability of intrahepatic vasodilators. Of note, cirrhotic livers exhibit reduced nitric oxide (NO) availability, owing to decreased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity and increased NO scavenging during elevated oxidative stress.⁷⁵ By contrast, liver iNOS expression is greater in the liver of cirrhotic rats than in sham controls.⁶⁹ This contrast is reminiscent of the local inhibition of eNOS by iNOS, possibly via NO autoinhibition, described in the kidneys.⁷⁷ As bile-duct-ligated rats produce MVs that increase iNOS expression in sinusoidal endothelial cells (Figure 4),¹⁰ MVs might promote intrahepatic vasoconstriction via an increase in hepatic iNOS expression leading to eNOS inhibition.

MVs and splanchnic arterial vasodilatation

Progressive splanchnic arterial vasodilatation also enhances portal blood flow, aggravating and perpetuating portal hypertension. Vasodilatation is associated with an increased release of vasodilators and a vascular hyporesponsiveness to vasoconstrictors. MVs seem to contribute to this so-called vascular hypocontractility in patients with advanced cirrhosis; indeed, we have shown that patients with Child–Pugh B or C cirrhosis have increased circulating levels of MVs of leukoendothelial, pan-leucocyte, lymphocyte, erythrocyte and hepatocyte origin.²⁴ These MVs impair the response of aortic rings to vasoconstrictive agents *ex vivo*, and decrease arterial blood pressure in mice via the transfer of phospholipids from MVs to endothelial cells. Phospholipid metabolism leads to the formation of prostacyclin, which diffuses abuminally and causes vascular smooth muscle relaxation (Figure 4). Although the origin of the MVs causing this effect was not identified, it is interesting to note that this hyporeactive effect is specific to circulating MVs in patients with advanced cirrhosis and was not

Table 2 | Stimuli of MV release relevant for liver diseases

Stimulus	Source of MVs	Content of MVs	Effect of MVs	Study
Oxidative stress	Rat primary hepatocyte	ND	ND	Miyoshi <i>et al.</i> (1996) ³⁹
High shear stress	Platelets	ND	Procoagulant	Nomura <i>et al.</i> (2000) ⁴³
PDGF BB	Rat HSC cell line Mouse cholangiocyte cell line	Hedgehog ligands	Activation of sinusoidal endothelial cells	Witek <i>et al.</i> (2009) ¹⁰
Lipopolysaccharide	HCC cell line H22	miRNA let7b	Decrease in inflammation	Li <i>et al.</i> (2012) ⁴⁸
IL-1- α	Endothelial cells	Caspase-3	ND	Abid Hussein <i>et al.</i> (2005) ⁴⁴
TNF	Endothelial cells	Tissue factor	Procoagulant	Szotowski <i>et al.</i> (2007) ⁴⁶
Fas ligand	Smooth muscle cells	ND	Endothelial dysfunction	Essayagh <i>et al.</i> (2005) ⁴⁵
Cholesterol	Monocytes	Tissue factor	Procoagulant	Liu <i>et al.</i> (2007) ⁴⁷
Fatty acid	Primary rat hepatocyte Human HCC cell line	Vanin-1	Proangiogenic	Povero <i>et al.</i> (2013) ⁴⁹

Abbreviations: HCC, hepatocellular carcinoma; HSC, hepatic stellate cell; MV, microvesicle; ND, not determined; PDGF BB, platelet-derived growth factor BB.

REVIEWS

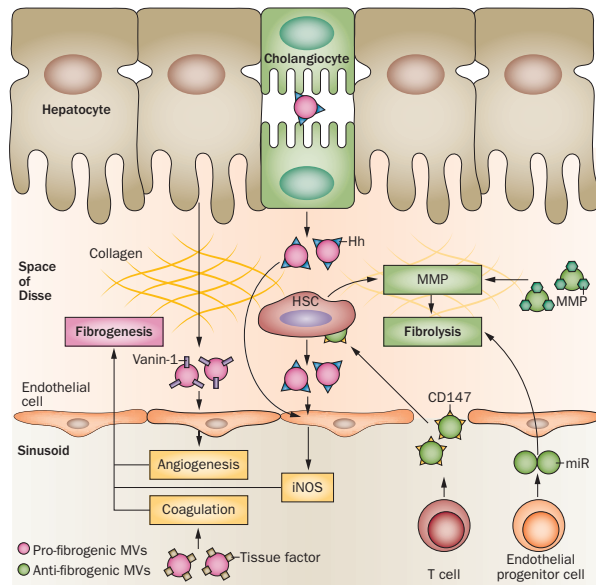


Figure 3 | Microvesicles in liver fibrosis. Some MVs (pink) promote fibrogenesis such as those produced by hepatocytes containing vanin-1 (which induce angiogenesis) or those that expose phosphatidylserine and/or tissue factor on their surface (activating coagulation). Cholangiocytes and HSCs release MVs containing Hh, which might also promote fibrogenesis by increasing iNOS expression. Other subpopulations of MVs decrease fibrosis (green). CD147-containing MVs released by T cells can be taken up into HSCs and upregulate MMP secretion. MVs containing MMP as well as miR-containing MVs released by endothelial progenitor cells might also promote fibrolysis. Abbreviations: Hh, Hedgehog ligand; HSC, hepatic stellate cell; iNOS, inducible nitric oxide synthase; miR, microRNA; MMP, matrix metalloproteinase; MV, microvesicle.

Box 3 | Liver sinusoidal endothelial cells and MV traffic

A key feature of sinusoidal endothelial cells should be kept in mind when interpreting the effects of microvesicles (MVs) present in the sinusoids on hepatic stellate cells or on hepatocytes: fenestrae (open pores that act as a dynamic filter). As the diameter of fenestrae ranges from 0.05–0.3 μm in humans, only some MVs can cross them in the healthy physiological state. Given the reported differential effect of MVs according to their size, this feature might confound the interpretation of consequences of MVs in the liver. The changes in fenestrae size in liver diseases further complicate this matter. For instance, fenestrae diameter increases after exposure to endotoxin. Finally, although MV size is defined as ranging from 0.1–1.0 μm whatever the species, fenestrae size varies between mice and humans, so observations made in one might not apply to the other.

observed with MVs from patients with Child–Pugh A cirrhosis or in patients with end-stage renal disease.²⁴ By contrast, circulating MVs in patients with septic shock increase thromboxane A2 production, which enhanced the sensitivity of mouse aorta to vasoconstrictors.

According to the authors of this study, these findings support a role for MVs in protecting against vascular hyporeactivity and hypotension in patients with septic shock.⁷⁸ Specific studies to determine the vascular consequences of MVs in patients with cirrhosis and septic shock are needed. As the outcome in these patients is poorer than in those with septic shock without cirrhosis, it is tempting to speculate that the effect of MVs related to cirrhosis predominate, enhancing vascular hyporeactivity and contributing to the severity of septic shock in cirrhosis.

Outside the liver, angiogenesis has been shown to contribute to the formation of portosystemic collaterals and increase in splanchnic blood flow.⁷⁵ Further studies are needed to address the role of MVs in this setting.

MVs and the complications of cirrhosis

To date, no direct evidence has shown that MVs have a role in the complications of cirrhosis, with the exception of portal hypertension, as stated earlier. However, several properties of MVs demonstrated in various non-digestive diseases suggest that MVs contribute to the development of ascites, hepatic encephalopathy, hepatopulmonary syndrome, portopulmonary hypertension and hepatorenal syndrome.

Ascites

Enhanced endothelial permeability in the mesenteric vascular bed contributes to the formation of ascites in cirrhosis,⁷⁹ and endothelial MVs might directly increase endothelial permeability.⁸⁰ This effect was initially reported in the pulmonary capillaries of C57BL/6 mice injected with endothelial MVs.⁸⁰ By contrast, another study found no increase in permeability with MVs generated following exposure of endothelial cells to exogenous activated protein C.⁸¹ However, this stimulus is not relevant to cirrhosis as protein C is synthesized by the liver, and the plasma levels of this protein are decreased in cirrhosis.⁸² MVs have been detected in the ascites of patients with ovarian^{83,84} and colorectal cancer,⁸⁵ but have not been measured in the ascites of patients with cirrhosis. In the past, the presence of ascites was considered to have little or no influence on the homeostasis of the peritoneal vasculature. However, this view has been challenged by several studies demonstrating that this liquid might possess vasodilatory, proinflammatory and proangiogenic properties.^{86–88} Further studies are needed to show if MVs contribute to these properties.

Hepatic encephalopathy

Hepatic encephalopathy is a result of astrocyte swelling and is aggravated by systemic inflammation related to increased levels of proinflammatory cytokines and lipopolysaccharide (LPS).⁸⁹ These systemic factors could interact with the brain parenchyma via the endothelial cells of the blood–brain barrier (BBB), in barrier-deficient areas, or by stimulation of peripheral nerves.⁹⁰ Some data suggest that MVs contribute to hepatic encephalopathy. First, patients with cirrhosis and encephalopathy have 3.5-fold more leukoendothelial

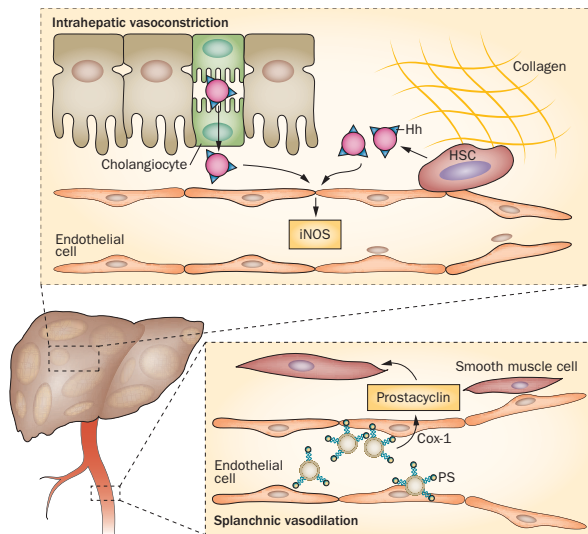


Figure 4 | Microvesicles in portal hypertension. Upper insert: In the cirrhotic liver, cholangiocytes and HSCs produce MVs containing Hh. These Hh-containing MVs induce endothelial expression of iNOS, probably contributing paradoxically to the intrahepatic vasoconstriction associated with cirrhosis. Vascular resistance is also increased by collagen deposition and contraction of HSCs, wrapped around endothelial cells. Lower insert: In cirrhosis, the splanchnic vascular bed is dilated. Levels of leukoendothelial, lymphocyte, erythrocyte and hepatocyte MVs are increased in the systemic circulation. These MVs expose PS at their surface that can be transferred (with other membrane phospholipids) to endothelial cells. Phospholipids are then used as substrates for the arachidonic acid pathway, including Cox-1 (which is an enzyme involved in the formation of vasodilator agents, such as prostacyclin), leading to smooth muscle cell relaxation. Abbreviations: Cox-1, cyclo-oxygenase-1; Hh, Hedgehog ligand; HSC, hepatic stellate cell; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MV, microvesicle; PS, phosphatidylserine.

MVs than those without encephalopathy.²⁴ Second, endothelial MVs might increase BBB endothelial cell permeability as they were shown to increase pulmonary capillary permeability in mice.⁸⁰ Third, brain endothelial cells might release MVs that induce astrocyte swelling. Indeed, the conditioned medium of endothelial cells pretreated with ammonia, LPS or proinflammatory cytokines causes astrocyte swelling.⁹¹ As LPS and proinflammatory cytokines are known triggers for MV release by endothelial cells (Table 2), astrocyte swelling might be mediated by MVs; this hypothesis needs to be confirmed in additional studies.

Pulmonary complications

Hepatopulmonary syndrome is defined by the clinical triad of chronic liver disease, arterial hypoxaemia and intrapulmonary vascular dilatations.⁹² It is characterized by dilatation of precapillary and capillary pulmonary vessels and an absolute increase in the number of dilated vessels, suggesting angiogenesis. Although the role of MVs in hepatopulmonary syndrome has not yet been assessed, it should be considered, because,

theoretically, MVs modulate the main mechanisms—pulmonary vasodilation and angiogenesis—involved in the development of this syndrome. MVs affecting lung vessels could be released by the injured liver and reach the pulmonary vasculature via the hepatic veins. Alternatively, MVs from the gut could reach the lungs through portosystemic collaterals. This latter hypothesis suggests that liver detoxification is essential to prevent pulmonary vascular dilatation, which is supported by the development of hepatopulmonary syndrome in patients with type 1 Abernethy malformation (defined as a direct connection between the portal vein and the inferior vena cava and the absence of a portal vein in the liver).⁹² Increasing evidence also suggests that MVs have a role in the pathophysiology of pulmonary hypertension, which might be relevant to the pathophysiology of portopulmonary hypertension, as reviewed elsewhere.⁹³

Hepatorenal syndrome

Hepatorenal syndrome is characterized by functional renal failure in patients with cirrhosis and ascites. MVs from patients with advanced cirrhosis could also have a role in hepatorenal syndrome by contributing to systemic and splanchnic vasodilation (a major factor in the pathogenesis of this syndrome), as already discussed.²⁴ Moreover, MVs have been shown to induce renal vasoconstriction in sickle cell disease, a mechanism that could also be involved in hepatorenal syndrome.⁹⁴

MVs and coagulation disorders

MVs are intrinsically procoagulant because they expose phosphatidylserine at their surface. Phosphatidylserine, an anionic phospholipid, interacts with positively charged domains in the clotting proteins such as factors VII, IX and X, and prothrombin,^{71,72} thereby promoting the assembly of the clotting cascade. Capture assays use this property to quantify levels of MVs. MVs can also expose tissue factor (a transmembrane glycoprotein that is the primary initiator of the coagulation cascade) at their surface. Tissue-factor-bearing MVs are highly procoagulant and mostly originate from monocytes.⁷²

Cirrhosis is associated with a procoagulant imbalance as shown by the results of thrombin-generation tests performed in the presence and absence of thrombomodulin.⁹⁵ In addition, clinical evidence now indicates that patients with cirrhosis are not protected from, and might even be at increased risk of, extrasplanchnic deep vein thrombosis.⁹⁶ This procoagulant state is thought to be a result of two alterations that are typically found in patients with cirrhosis: markedly increased factor VIII plasma levels (one of the most potent drivers of thrombin generation) and a concomitant decrease in protein C levels (one of the most potent anticoagulant drivers that quenches thrombin generation).⁹⁷ Even though the thrombin generation assay has been very useful to evaluate the coagulation alterations associated with cirrhosis, it has several limitations. In particular, it does not take into account the procoagulant activity of MVs as it is performed after adding exogenous phospholipids and tissue factor to plasma to trigger coagulation. Although

at low concentrations, these agents could overwhelm the endogenous procoagulant activity of MVs.

The role of phosphatidylserine in the procoagulant imbalance associated with cirrhosis might not be significant, as no difference was seen in the levels of phosphatidylserine-positive MVs between patients with cirrhosis and healthy controls in one study. However, another group found increased levels of phosphatidylserine-positive MVs in patients with cirrhosis in a smaller patient population.^{20,24} Tissue-factor-positive MVs might have a more important role in the increased coagulability associated with cirrhosis than those exposing only phosphatidylserine at their surface. Indeed, levels of these highly procoagulant MVs are elevated in patients with cirrhosis potentially as a result of endotoxaemia, a common feature of cirrhosis⁹⁸ known to induce tissue factor expression in monocytic and endothelial cells and the release of tissue-factor-positive MVs.^{72,99}

Although haemostatic abnormalities are an invariable feature of acute liver failure, patients rarely develop bleeding complications despite substantially elevated international normalized ratio of prothrombin times.¹⁰⁰ Indeed, patients with acute liver failure seem to be more prone to thrombosis than to bleeding complications, and intrahepatic thrombosis might exacerbate initial liver injury.¹⁰¹ Studies in patients and in animal models suggest that MVs contribute to this surprisingly normal or hypercoagulable global haemostasis in acute liver failure.^{27,29,102} The procoagulant activity of MVs due to tissue factor and phosphatidylserine in patients with acute liver injury is 38-fold and fourfold higher respectively than that in healthy controls.^{27,29} Increased levels of procoagulant platelet-derived MVs have also been observed in a mouse model of sepsis, which is associated with multiorgan failure, including the liver.¹⁰² When these MVs are reinjected into nonseptic mice, they promote thrombi formation in the liver. Interestingly, transgenic mice expressing low levels of calpain (a protein involved in MV formation) not only have decreased levels of procoagulant MVs when they are exposed to sepsis as compared with mice with normal calpain levels, but also less disseminated intravascular coagulation and improved organ function and survival.¹⁰²

MVs and hepatocellular carcinoma

Studies published over the past 5 years assessing levels of circulating MVs in large groups of patients with cancer did not include patients with hepatocellular carcinoma (HCC).^{17,103} One pilot study investigating MV levels in a small group of patients with HCC reported associations between tumour size and plasma levels of hepatic and endothelial MVs.²⁰ Moreover, MV levels progressively decreased once HCC was removed by liver transplantation.²⁰

Several groups have investigated the role of MVs in the development of cancer¹⁰⁴ and some of these findings can be tentatively extended to HCC (Figure 4). First, angiogenesis (a key feature of HCC) was demonstrated to be promoted by the transfer of oncogenic proteins by MVs.¹⁰⁵

In vitro experiments revealed that several human cancer cells lines produce MVs containing the oncogenic epidermal growth factor receptor (EGFR) that could be taken up by endothelial cells and enhance angiogenesis.¹⁰⁵ Moreover, in mice with human tumour xenografts, diannexin reduced the growth rate and microvascular density of tumours.¹⁰⁵ Second, MVs containing active oncogenes (oncosomes) might also serve as vehicles for rapid intercellular transfer of transforming activity between cells populating tumours. For instance, glioma cells expressing a truncated and oncogenic form of EGFR, called EGFRvIII, release MVs containing this receptor. Such MVs can merge with plasma membranes of cancer cells lacking EGFRvIII, and so transfer the oncogenic activity.¹⁰⁶ Third, MVs might also favour multidrug resistance, a major cause of unsuccessful cancer treatment. Multidrug resistance is caused by overexpression of efflux transporters (such as P-glycoprotein), and MVs can transfer P-glycoprotein intercellularly from multidrug-resistant donor cells to drug-sensitive recipient cells.¹⁰⁷ Moreover, the expression of genes associated with vesicle shedding correlates with chemosensitivity profiles.¹⁰⁸

In patients with HCC, stromal and vascular invasions contribute to tumour progression. MVs containing CD147 can be released by T cells as well as by tumour cells, thus stimulating expression of matrix metalloproteinases in fibroblasts and facilitating tumour invasion and metastasis.^{22,109} Findings from a study published in 2013 indicate that MVs are involved in the acquisition of a metastatic phenotype by HCC. MVs released *in vitro* by mouse innate immune cells were taken up by a cultured mouse HCC cell line leading to tumour cell migration, invasion and attachment to the endothelium *in vitro* and to metastasis when injected into mice.¹¹⁰ This effect was mediated by integrin α -M-integrin β -2 (also known as CD11b-CD18), an integrin involved in migration and cell adhesion, which was transferred from immune cells to tumour cells via MVs (Figure 5).¹¹⁰ These results indicate that MVs derived from activated innate immune cells can act as a ferry to transfer innate molecules to tumour cells, leading to tumour metastasis.

MVs could also have anti-tumoral properties as MVs generated *in vitro* from human adult liver stem cells were shown to inhibit proliferation and induce apoptosis of HCC cells (HepG2 cell line and primary hepatocellular cells) both *in vitro* and in mice by delivering microRNAs.¹¹¹ This biological effect was specific as it was not observed with MVs derived from human fibroblasts even after they were modified to facilitate their incorporation into HCC cells. However, one limitation of this study was that the procedure used to isolate the MVs also isolated exosomes.

Altogether, these data suggest that MVs stimulate, more than inhibit, the development of HCC. This view is supported by the inhibition of tumour progression induced by diannexin.¹⁰⁵

MVs as biomarkers for liver diseases

Portal vein thrombosis is uncommon in patients with compensated cirrhosis, but the incidence seems to rise

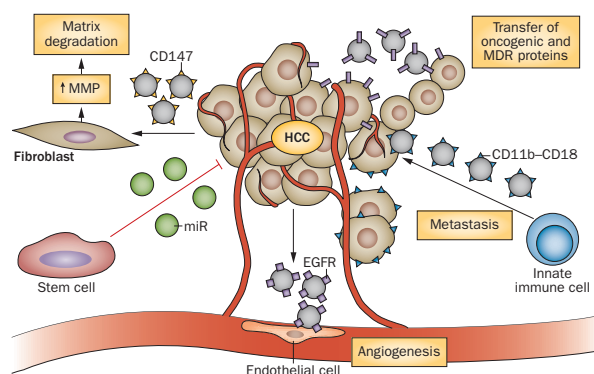


Figure 5 | Microvesicles in hepatocellular carcinoma. HCC cells might release MVs that interact with neighbouring cells to promote carcinogenesis. Tumoral stroma contains fibroblasts, which can favour tumoral progression. Tumour MVs containing CD147 induce upregulation of MMPs in fibroblasts, leading to extracellular matrix degradation and tumoral invasion. Tumour MVs can also transfer oncogenic forms of growth factor receptor or multidrug-resistant proteins to other tumour cells, thus propagating an increased proliferative, survival, and/or mitogenic capacity. In addition, EGFR, which is upregulated in HCC, could be transferred via tumour MVs to endothelial cells to promote angiogenesis to vascularize the growing tumour. Non-tumour cells can promote HCC metastasis via release of MVs: innate immune cells produce MVs harbouring CD11b-CD18, which can be taken up by HCC cells and promote their capacity of migration, invasion, attachment to the endothelium and metastasis. Non-tumour cells can also produce MVs with antitumoural properties. For instance, stem cells release MVs containing miR that inhibit proliferation of hepatic tumour cells. Abbreviations: HCC, hepatocellular carcinoma; MDR, multidrug resistant; MMP, matrix metalloproteinase; miR, microRNA; MV, microvesicle.

with the severity of liver disease.⁷³ The use of anticoagulants, however, decreases the risk of portal vein thrombosis.¹¹² Biomarkers of the risk of thrombosis could help to select patients who can benefit most from anticoagulant therapy and avoid exposing patients who have a low risk of thrombosis to the complications of this treatment. Data from patients without liver disease and the lack of increase in annexin V-positive MVs in patients with cirrhosis, suggest that phosphatidylserine-positive MVs or platelet MVs will probably not be useful as biomarkers.²⁴ On the other hand, MVs containing tissue factor might be more helpful.^{17,99}

Levels of MVs originating from CD4⁺ and CD8⁺ T cells are increased in patients with chronic hepatitis C, whereas levels of MVs from CD14⁺ and invariant natural killer T cells are augmented in patients with NAFLD.²⁵ This observation might be helpful in identifying the cause of liver blood test abnormalities in patients with HCV infection and the metabolic syndrome after liver transplantation. In this context, MVs could also help to exclude acute rejection as after liver transplantation, the dynamic course of circulating MVs seems to be modified by acute rejection.²⁰ Indeed, levels of MVs in the plasma in one patient who developed rejection remained elevated whereas levels progressively decreased after surgery in patients without rejection.²⁰ Other investigators have shown that miR-146a was upregulated sixfold

in circulating MVs isolated from rats with acute rejection of a liver transplant.¹¹³

Circulating MVs are potential noninvasive markers of disease severity and activity in chronic hepatitis C, NAFLD and cirrhosis,²² but these promising results must be validated in independent cohorts. The potential added value of measuring plasma MV levels should be compared with that of other available noninvasive tools, such as transient elastography, NAFLD-fibrosis score and MELD score, respectively.

MVs might also be valuable biomarkers for acute liver diseases. Plasma MV levels were considerably increased in 50 patients with acute liver injury or acute liver failure when compared with healthy individuals.²⁹ MV levels were associated with the presence of the systemic inflammatory response syndrome. Multivariate logistic regression analysis showed that MV concentrations were independently associated with death and liver transplantation in patients with acute liver failure.²⁹ Most of the circulating MVs found in these patients were positive for the platelet marker CD41. Thus, MVs with a prognostic value for acute liver failure are not produced by liver cells but by platelets, supporting the hypothesis that the severity of acute liver failure is related to systemic inflammatory response syndrome and coagulopathy. Other authors have reported that haematopoietic stem cell MVs are increased in patients with acute liver failure.³⁰

Future directions

Marked progress in the field of MVs will be made once investigators pay close attention to both the preanalytical and analytical conditions for studying these particles. The efforts made by the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) and International Society of Extracellular Vesicles (ISEV) over the past 3 years will hopefully lead to standardization of the isolation procedures and identification and analysis of MVs and other extracellular vesicles.^{1,114} Two ongoing projects are working on this standardization: the European Metrology Research Programme (EMRP) project MetVes,¹¹⁵ and the European Cooperation in Science and Technology (COST) programme 'Microvesicles and Exosomes in Health and Disease (ME-HAD).'¹⁶¹

MVs have promise as biomarkers for diagnostic and prognostic purposes in patients with acute or chronic liver diseases as they are implicated as having roles in many stages of liver disease development and progression. In the future, investigators will have to validate these promising results in large independent cohorts of patients. Importantly, the added value of MV measurement will have to be compared with other already available and pertinent biomarkers. Investigators will also have to develop new strategies to provide routinely available MV assays, so they are no longer restricted to expert laboratories. Original approaches will probably be developed, including analysis of the cargo of MVs, such as microRNAs. From a pathophysiological point of view, *in vivo* studies are urgently needed owing to the sometimes contrasting observations made using *in vitro* MVs, as seen in fibrosis.

REVIEWS

In the future, MVs might be used as therapeutic targets, such as MVs promoting liver tumorigenesis. However, specific inhibition of certain types of MVs without affecting the mother cell remains tricky. MVs are more likely to be used as therapeutic vectors, for instance to enhance liver regeneration. Indeed, MVs released by human liver stem cells *in vitro* were able to accelerate recovery of liver after hepatectomy in rats.¹¹⁷ This capacity was directly related to the transfer of specific mRNA from liver stem cells to hepatocytes by MVs. Labelling of MVs with magnetic nanoparticles could be used in the future for targeting and concentrating MVs in the liver.⁵⁰

Conclusions

MVs seem to be active mediators of intercellular communication in liver diseases. On the one hand, the injured liver releases MVs that act locally in a paracrine manner to modulate key processes such as fibrosis, angiogenesis, intrahepatic vasoconstriction and tumour

development. MVs might also target remote organs such as the brain and induce hepatic encephalopathy. On the other hand, other organs and cells release MVs that might influence liver disease development and progression; for example, MVs produced by circulating cells might modulate fibrosis. Several preliminary studies have shown that MVs are promising biomarkers for liver diseases.

Review criteria

We searched PubMed for full-text publications in English that contained the terms "microvesicles", "microvesicle", "microparticles", "microparticle", "ectosomes" or "ectosome". Additional papers were identified by cross-checking the reference lists of previously identified papers. We also used our collections of published articles related to liver diseases and microvesicles. No date limitations were applied. We performed the final search on 14 October 2013.

1. Witwer, K. W. *et al.* Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell. Vesicles* **2**, 20360 (2013).
2. van der Pol, E., Boing, A. N., Harrison, P., Sturk, A. & Nieuwland, R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol. Rev.* **64**, 676–705 (2012).
3. Connor, D. E., Exner, T., Ma, D. D. & Joseph, J. E. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb. Haemost.* **103**, 1044–1052 (2010).
4. Mause, S. F. & Weber, C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res.* **107**, 1047–1057 (2010).
5. Rautou, P. E. & Mackman, N. Deletion of microvesicles from the circulation. *Circulation* **125**, 1601–1604 (2012).
6. Bernimoulin, M. *et al.* Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 1019–1028 (2009).
7. Leroyer, A. S. *et al.* CD40 ligand microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis: a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J. Am. Coll. Cardiol.* **52**, 1302–1311 (2008).
8. Berckmans, R. J., Sturk, A., van Tienen, L. M., Schaap, M. C. & Nieuwland, R. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood* **117**, 3172–3180 (2011).
9. Rood, I. M. *et al.* Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. *Kidney Int.* **78**, 810–816 (2010).
10. Wittek, R. P. *et al.* Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells. *Gastroenterology* **136**, 320–330 (2009).
11. Boilard, E. *et al.* Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* **327**, 580–583 (2010).
12. Chahed, S. *et al.* Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. *Diabetes* **59**, 694–701 (2010).
13. Franz, C. *et al.* Procoagulant tissue factor-exposing vesicles in human seminal fluid. *J. Reprod. Immunol.* **98**, 45–51 (2013).
14. Leroyer, A. S. *et al.* Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation* **119**, 2808–2817 (2009).
15. Baron, M. *et al.* PPAR α activation differentially affects microparticle content in atherosclerotic lesions and liver of a mouse model of atherosclerosis and NASH. *Atherosclerosis* **218**, 69–76 (2011).
16. Amabile, N., Rautou, P. E., Tedgui, A. & Boulanger, C. M. Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* **36**, 907–916 (2010).
17. Rautou, P. E. & Mackman, N. Microvesicles as risk markers for venous thrombosis. *Expert Rev. Hematol.* **6**, 91–101 (2013).
18. Zahra, S., Anderson, J. A., Stirling, D. & Ludlam, C. A. Microparticles, malignancy and thrombosis. *Br. J. Haematol.* **152**, 688–700 (2011).
19. Fusegawa, H. *et al.* Platelet activation in patients with chronic hepatitis C. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **27**, 101–106 (2002).
20. Brodsky, S. V. *et al.* Dynamics of circulating microparticles in liver transplant patients. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **17**, 261–268 (2008).
21. Sayed, D., Amin, N. F. & Galal, G. M. Monocyte-platelet aggregates and platelet micro-particles in patients with post-hepatic liver cirrhosis. *Thromb. Res.* **125**, e228–e233 (2010).
22. Kornek, M., Popov, Y., Libermann, T. A., Afdhal, N. H. & Schuppan, D. Human T cell microparticles circulate in blood of hepatitis patients and induce fibrolytic activation of hepatic stellate cells. *Hepatology* **53**, 230–242 (2011).
23. Ogasawara, F. *et al.* Platelet activation in patients with alcoholic liver disease. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **30**, 41–48 (2005).
24. Rautou, P. E. *et al.* Abnormal plasma microparticles impair vasoconstrictor responses in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* **143**, 166–176 (2012).
25. Kornek, M. *et al.* Circulating microparticles as disease-specific biomarkers of severity of inflammation in patients with hepatitis C or nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **143**, 448–458 (2012).
26. Esch, J. S. *et al.* Platelet activation and increased tissue factor expression on monocytes in reperfusion injury following orthotopic liver transplantation. *Platelets* **21**, 348–359 (2010).
27. Agarwal, B. *et al.* Evaluation of coagulation abnormalities in acute liver failure. *J. Hepatol.* **57**, 780–786 (2012).
28. Agarwal, B. *et al.* Hemostasis in patients with acute kidney injury secondary to acute liver failure. *Kidney Int.* **84**, 158–163 (2013).
29. Stravitz, R. T. *et al.* Role of procoagulant microparticles in mediating complications and outcome of acute liver injury/acute liver failure. *Hepatology* **58**, 304–313 (2013).
30. Schmelzle, M. *et al.* Increased plasma levels of microparticles expressing CD39 and CD133 in acute liver injury. *Transplantation* **95**, 63–69 (2013).
31. Chen, Y., Davis-Gorman, G., Watson, R. R. & McDonagh, P. F. Platelet CD62p expression and microparticle in murine acquired immune deficiency syndrome and chronic ethanol consumption. *Alcohol* **38**, 25–30 (2003).
32. Meckes, D. G. Jr & Raab-Traub, N. Microvesicles and viral infection. *J. Virol.* **85**, 12844–12854 (2011).
33. Diamant, M. *et al.* Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* **106**, 2442–2447 (2002).
34. Esposito, K. *et al.* Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 3676–3679 (2006).
35. Ferreira, A. C. *et al.* Postprandial hypertriglyceridemia increases circulating levels of endothelial cell microparticles. *Circulation* **110**, 3599–3603 (2004).
36. Navasoliava, N. M. *et al.* Enforced physical inactivity increases endothelial microparticle levels in healthy volunteers. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **299**, H248–H256 (2010).
37. Guicciardi, M. E. & Gores, G. J. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression. *Semin. Liver Dis.* **30**, 402–410 (2010).
38. Violi, F. *et al.* Patients with liver cirrhosis suffer from primary haemostatic defects? Fact or fiction? *J. Hepatol.* **55**, 1415–1427 (2011).

39. Miyoshi, H. *et al.* Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology* **110**, 1897–1904 (1996).
40. Cazzaniga, M. *et al.* Increased flow-mediated vasodilation in cirrhotic patients with ascites: relationship with renal resistive index. *Liver Int.* **28**, 1396–1401 (2008).
41. Tazi, K. A. *et al.* Role of shear stress in aortic eNOS up-regulation in rats with biliary cirrhosis. *Gastroenterology* **122**, 1869–1877 (2002).
42. Rasaratnam, B., Kaye, D., Jennings, G., Dudley, F. & Chin-Dusting, J. The effect of selective intestinal decontamination on the hyperdynamic circulatory state in cirrhosis. A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **139**, 186–193 (2003).
43. Nomura, S., Nakamura, T., Cone, J., Tandon, N. N. & Kambayashi, J. Cytometric analysis of high shear-induced platelet microparticles and effect of cytokines on microparticle generation. *Cytometry* **40**, 173–181 (2000).
44. Abid Hussein, M. N. *et al.* Cell-derived microparticles contain caspase 3 *in vitro* and *in vivo*. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 888–896 (2005).
45. Essayagh, S. *et al.* Microparticles from apoptotic vascular smooth muscle cells induce endothelial dysfunction, a phenomenon prevented by β 3-integrin antagonists. *Thromb. Haemost.* **94**, 853–858 (2005).
46. Sztowski, B. *et al.* Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **73**, 806–812 (2007).
47. Liu, M. L., Reilly, M. P., Casasanto, P., McKenzie, S. E. & Williams, K. J. Cholesterol enrichment of human monocyte/macrophages induces surface exposure of phosphatidylserine and the release of biologically-active tissue factor-positive microvesicles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 430–435 (2007).
48. Li, D. *et al.* TLR4 signaling induces the release of microparticles by tumor cells that regulate inflammatory cytokine IL-6 of macrophages via microRNA let-7b. *Oncimmunology* **1**, 687–693 (2012).
49. Povero, D. *et al.* Lipid-induced toxicity stimulates hepatocytes to release angiogenic microparticles that require vanin-1 for uptake by endothelial cells. *Sci. Signal.* **6**, ra88 (2013).
50. Al Faraj, A. *et al.* Endothelial cell-derived microparticles loaded with iron oxide nanoparticles: feasibility of MR imaging monitoring in mice. *Radiology* **263**, 169–178 (2012).
51. Willekens, F. L. *et al.* Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* **105**, 2141–2145 (2005).
52. Gomez, F., Ruiz, P. & Schreiber, A. D. Impaired function of macrophage Fc γ receptors and bacterial infection in alcoholic cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1122–1128 (1994).
53. Chen, L., Pan, D. D., Zhou, J. & Jiang, Y. Z. Protective effect of selenium-enriched *Lactobacillus* on CCl₄-induced liver injury in mice and its possible mechanisms. *World J. Gastroenterol.* **11**, 5795–5800 (2005).
54. Rimola, A. *et al.* Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology* **4**, 53–58 (1984).
55. Tanimoto, A. *et al.* Superparamagnetic iron oxide-mediated hepatic signal intensity change in patients with and without cirrhosis: pulse sequence effects and Kupffer cell function. *Radiology* **222**, 661–666 (2002).
56. Dasgupta, S. K., Le, A., Chavakis, T., Rumbaut, R. E. & Thiagarajan, P. Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. *Circulation* **125**, 1664–1672 (2012).
57. Distler, J. H. *et al.* The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 2892–2897 (2005).
58. Taraboletti, G. *et al.* Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **160**, 673–680 (2002).
59. Gasser, O. *et al.* Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp. Cell. Res.* **285**, 243–257 (2003).
60. Szabo, G. & Bala, S. MicroRNAs in liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 542–552 (2013).
61. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
62. Diehl, P. *et al.* Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc. Res.* **93**, 633–644 (2012).
63. Cantaluppi, V. *et al.* Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* **82**, 412–427 (2012).
64. Thabut, D. & Shah, V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J. Hepatol.* **53**, 976–980 (2010).
65. Mause, S. F. *et al.* Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. *Circulation* **122**, 495–506 (2010).
66. Benameur, T., Soletti, R., Porro, C., Andriantsitohaina, R. & Martinez, M. C. Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS ONE* **5**, e12688 (2010).
67. Deregibus, M. C. *et al.* Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* **110**, 2440–2448 (2007).
68. Friedman, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* **88**, 125–172 (2008).
69. Thabut, D. *et al.* High-density lipoprotein administration attenuates liver proinflammatory response, restores liver endothelial nitric oxide synthase activity, and lowers portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* **46**, 1893–1906 (2007).
70. Aram, G., Potter, J. J., Liu, X., Torbenson, M. S. & Mezey, E. Lack of inducible nitric oxide synthase leads to increased hepatic apoptosis and decreased fibrosis in mice after chronic carbon tetrachloride administration. *Hepatology* **47**, 2051–2058 (2008).
71. Nieuwland, R. *et al.* Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* **95**, 930–935 (2000).
72. Owens, A. P. 3rd & Mackman, N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ. Res.* **108**, 1284–1297 (2011).
73. Valla, D. C. Thrombosis and anticoagulation in liver disease. *Hepatology* **47**, 1384–1393 (2008).
74. Teoh, N. C. *et al.* Diannexin, a novel annexin V homodimer, provides prolonged protection against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Gastroenterology* **133**, 632–646 (2007).
75. Garcia-Pagan, J. C., Gracia-Sancho, J. & Bosch, J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *J. Hepatol.* **57**, 458–461 (2012).
76. Lemoine, S. *et al.* Portal myofibroblasts promote liver angiogenesis through the release of microparticles and interaction with cholangiocytes. *Hepatology* **56**, 304A–305A (2012).
77. Schwartz, D. *et al.* Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J. Clin. Invest.* **100**, 439–448 (1997).
78. Mostefaj, H. A. *et al.* Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **178**, 1148–1155 (2008).
79. Meigar-Lesmes, P. *et al.* Vascular endothelial growth factor and angiotensin-2 play a major role in the pathogenesis of vascular leakage in cirrhotic rats. *Gut* **58**, 285–292 (2009).
80. Densmore, J. C. *et al.* Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock* **26**, 464–471 (2006).
81. Perez-Casal, M. *et al.* Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *Haematologica* **94**, 387–394 (2009).
82. Tripodi, A. & Mannucci, P. M. The coagulopathy of chronic liver disease. *N. Engl. J. Med.* **365**, 147–156 (2011).
83. Press, J. Z. *et al.* Microparticles from ovarian carcinomas are shed into ascites and promote cell migration. *Int. J. Gynecol. Cancer* **22**, 546–552 (2012).
84. Ginestra, A., Micelli, D., Dolo, V., Romano, F. M. & Vittorelli, M. L. Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res.* **19**, 3439–3445 (1999).
85. Choi, D. S. *et al.* Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer ascites. *Proteomics* **11**, 2745–2751 (2011).
86. Cejudo-Martin, P. *et al.* Hypoxia is an inducer of vasodilator agents in peritoneal macrophages of cirrhotic patients. *Hepatology* **36**, 1172–1179 (2002).
87. Jimenez, W. *et al.* Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in peritoneal macrophages of cirrhotic patients. *Hepatology* **30**, 670–676 (1999).
88. Morales-Ruiz, M. *et al.* Ascites from cirrhotic patients induces angiogenesis through the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *J. Hepatol.* **43**, 85–91 (2005).
89. Wright, G. & Jalan, R. Ammonia and inflammation in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: Pandora's box? *Hepatology* **46**, 291–294 (2007).
90. Wright, G. *et al.* Endotoxemia produces coma and brain swelling in bile duct ligated rats. *Hepatology* **45**, 1517–1526 (2007).
91. Jayakumar, A. R., Tong, X. Y., Ospel, J. & Norenberg, M. D. Role of cerebral endothelial cells in the astrocyte swelling and brain edema associated with acute hepatic encephalopathy. *Neuroscience* **218**, 305–316 (2012).
92. Rodriguez-Roisin, R. & Krowka, M. J. Hepatopulmonary syndrome—a liver-induced lung vascular disorder. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2378–2387 (2008).
93. Amabile, N. *et al.* Cellular microparticles in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **42**, 272–279 (2013).

REVIEWS

94. Camus, S. M. *et al.* Erythrocyte microparticles can induce kidney vaso-occlusions in a murine model of sickle cell disease. *Blood* **120**, 5050–5058 (2012).
95. Tripodi, A. *et al.* An imbalance of pro- vs anti-coagulation factors in plasma from patients with cirrhosis. *Gastroenterology* **137**, 2105–2111 (2009).
96. Tripodi, A., Anstee, Q. M., Sogaard, K. K., Primignani, M. & Valla, D. C. Hypercoagulability in cirrhosis: causes and consequences. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 1713–1723 (2011).
97. Tripodi, A., Primignani, M., Lemma, L., Chantarangkul, V. & Mannucci, P. M. Evidence that low protein C contributes to the procoagulant imbalance in cirrhosis. *J. Hepatol.* **59**, 265–270 (2013).
98. Wiest, R. & Garcia-Tsao, G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* **41**, 422–433 (2005).
99. Rautou, P.-E., Vion, A.-C., Luyendyk, J. P. & Mackman, N. Microparticle tissue factor activity is increased in patients with cirrhosis. *Hepatology* (in press).
100. Stravitz, R. T. *et al.* Minimal effects of acute liver injury/acute liver failure on hemostasis as assessed by thromboelastography. *J. Hepatol.* **56**, 129–136 (2012).
101. Ganey, P. E. *et al.* Role of the coagulation system in acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Hepatology* **46**, 1177–1186 (2007).
102. Zafrani, L. *et al.* Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 744–755 (2012).
103. Thaler, J. *et al.* Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 1363–1370 (2012).
104. Rak, J. Microparticles in cancer. *Semin. Thromb. Hemost.* **36**, 888–906 (2010).
105. Al-Nedawi, K., Meehan, B., Kerbel, R. S., Allison, A. C. & Rak, J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 3794–3799 (2009).
106. Al-Nedawi, K. *et al.* Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **10**, 619–624 (2008).
107. Jaiswal, R. *et al.* Microparticle-associated nucleic acids mediate trait dominance in cancer. *FASEB J.* **26**, 420–429 (2012).
108. Shedden, K., Xie, X. T., Chandaroy, P., Chang, Y. T. & Rosania, G. R. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res.* **63**, 4331–4337 (2003).
109. Sidhu, S. S., Mengistab, A. T., Tauscher, A. N., LaVail, J. & Basbaum, C. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor–stromal interactions. *Oncogene* **23**, 956–963 (2004).
110. Ma, J. *et al.* Innate immune cell-derived microparticles facilitate hepatocarcinoma metastasis by transferring integrin $\alpha(M)\beta(2)$ to tumor cells. *J. Immunol.* **191**, 3453–3461 (2013).
111. Fonsato, V. *et al.* Human liver stem cell-derived microvesicles inhibit hepatoma growth in SCID mice by delivering antitumor microRNAs. *Stem Cells* **30**, 1985–1998 (2012).
112. Villa, E. *et al.* Enoxaparin prevents portal vein thrombosis and liver decompensation in patients with advanced cirrhosis. *Gastroenterology* **143**, 1253–1260 (2012).
113. Hu, J. *et al.* Plasma microRNA, a potential biomarker for acute rejection after liver transplantation. *Transplantation* **95**, 991–999 (2013).
114. Lacroix, R. *et al.* Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 1190–1193 (2013).
115. European Association of National Metrology Institutes (EURA-MET). Metrological characterisation of micro-vesicles from body fluids as non-invasive diagnostic biomarkers [online], <http://www.metves.eu> (2014).
116. European Cooperation in Science and Technology (COST). *European Network on Microvesicles and Exosomes in Health and Disease (ME-HAD)* [online], http://www.cost.eu/domains_actions/bmbs/Actions/BM1202 (2012).
117. Herrera, M. B. *et al.* Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 1605–1618 (2010).

Acknowledgements

This authors of this Review receive funding for laboratory research from the Société Nationale Française de Gastroentérologie (SNFGE), the Association Française pour l'Étude du Foie (AFEF) and the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-12-EMMA-0012-03).

Author contributions

S. Lemoine and P.-E. Rautou contributed to all aspects of the preparation of this manuscript. D. Thabut, C. Housset, R. Moreau, D. Valla and C. M. Boulanger contributed to discussion of content and reviewing/editing the manuscript before submission.

3) Article original sur le rôle angiogénique des MFP

Portal myofibroblasts promote vascular remodeling underlying cirrhosis formation through the release of microparticles

Sara Lemoine,^{1,2} Axelle Cadoret,^{1,2} Pierre-Emmanuel Rautou,^{3,4} Haquima El Mourabit,^{1,2}

Vlad Ratziu,^{1,2,5} Christophe Corpechot,^{1,2,6} Colette Rey,^{1,2} Nelly Bosselut,^{1,2} Véronique Barbu,^{1,2} Dominique Wendum,^{1,2,7} Gérard Feldmann,^{†8} Chantal Boulanger,³ Corneliu Henegar,⁹ Chantal Housset,^{1,2,6#} Dominique Thabut,^{1,2,5#}

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CDR Saint-Antoine & Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Paris, France; ²INSERM, UMR_S 938, Paris, France ; ³Université Paris Descartes & INSERM, UMR_S 970, Paris Cardiovascular Research Center - PARCC, Paris, France; ⁴Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Beaujon, Service d'Hépatologie, Clichy, France; ⁵Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié Salpêtrière, Service d'Hépatogastroentérologie, Paris, France; ⁶Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Centre de Référence des Maladies Inflammatoires des Voies Biliaires (CMR MIVB) & Service d'Hépatologie, Paris, France ; ⁷Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomo-Pathologie, Paris, France; ⁸Université Paris 7- Denis Diderot & INSERM, UMR_S 773, Paris, France; ⁹HudsonAlpha Institute for Biotechnology, Huntsville, AL 35806, USA.

Chantal Housset and Dominique Thabut contributed equally to this work.

This work is dedicated to the memory of Gérard Feldmann.

Sara Lemoine: sara_lemoine@yahoo.fr

Axelle Cadoret: axelle.cadoret@inserm.fr

Pierre-Emmanuel Rautou: pierre-emmanuel.rautou@inserm.fr

Haquima El Mourabit: haquima.el-mourabit@inserm.fr

Vlad Ratziu: vratziu@teaser.fr

Christophe Corpechot: christophe.corpechot@sat.aphp.fr

Colette Rey: colette.rey@inserm.fr

Nelly Bosselut: nelly.bosselut@pbr.aphp.fr

Véronique Barbu: veronique.barbu@inserm.fr

Dominique Wendum: dominique.wendum@sat.aphp.fr

Chantal Boulanger: chantal.boulanger@inserm.fr

Corneliu Henegar: corneliu@henegar.info

Chantal Housset: chantal.housset@inserm.fr

Dominique Thabut: dthabut@gmail.com

Keywords:

Angiogenesis; Collagen, type XV, alpha 1; Liver endothelial cells; Liver fibrosis;
Vascular endothelial growth factor A.

Contact information:

Prof Chantal Housset, Inserm UMR_S 938, Faculté de Médecine & Université Pierre
et Marie Curie, Site Saint-Antoine, 27 rue Chaligny, 75571 Paris cedex 12, France. Phone:
(33) 140011359; Fax: (33) 140011426; E-mail: chantal.housset@inserm.fr

Abbreviations:

α -SMA, alpha-smooth muscle actin; HSC, hepatic stellate cells; PMF, portal myofibroblasts; COL15A1, collagen, type XV, alpha 1; VEGF, vascular endothelial growth factor; LSEC, liver sinusoidal endothelial cells; HSC-MF, HSC-derived myofibroblasts; P, passage; TSEC, transformed sinusoidal endothelial cells; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; NRC, normal rat cholangiocytes; FDR, false discovery rate; SAM, significance analysis of microarrays; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; CK, cytokeratin; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; BDL, biliary duct ligation; vWF, von Willebrand Factor; qHSC, quiescent HSC ; CM, conditioned medium.

Financial support:

This work was supported by funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under agreement no. HEALTHF2-2009-241762 for the project Fatty Liver Inhibition of Progression (FLIP); the French National Agency through the national programme "Investissements d'avenir" reference ANR-10-IAHU-05; the Association Française pour l'Etude des Maladies du Foie (AFEF); by the Fonds Cholangite Sclérosante Primitive (CSP) and INSERM (Contrat d'Interface Hospitalier) to C. Housset. S. Lemoine received grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and INSERM (Poste d'Accueil).

Conflicts of interest: The authors have no conflict of interest to disclose.

ABSTRACT

Liver fibrosis expanding from portal tracts and vascular remodeling are determinant factors in the progression of liver diseases to cirrhosis. In the present study, we examined the potential contribution of portal myofibroblasts (PMF) to the vascular changes leading to cirrhosis. The analyses of liver cells based on the transcriptome of rat PMF compared to hepatic stellate cell-derived myofibroblasts in culture, identified COL15A1 as a marker of PMF. Normal liver contained rare COL15A1-immunoreactive cells adjacent to the bile ducts and canals of Hering in the portal area. A marked increase in COL15A1 expression occurred together with that of the endothelial cell marker vWF, in human and rat liver tissue, at advanced stages of fibrosis caused by either biliary or hepatocellular injury. In cirrhotic liver, COL15A1-expressing PMF adopted a perivascular distribution outlining vascular capillaries proximal to reactive ductules, within large fibrotic septa. The effect of PMF on endothelial cells was evaluated by *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays. PMF-conditioned medium increased the migration and tubulogenesis of liver endothelial cells and human umbilical vein endothelial cells, and triggered angiogenesis within Matrigel plugs in mice. In co-culture, PMF developed intercellular junctions with endothelial cells and enhanced the formation of vascular structures. PMF released VEGFA-containing microparticles, which activated VEGFR-2 in endothelial cells and largely mediated their proangiogenic effect. Cholangiocytes potentiated the angiogenic properties of PMF by increasing VEGFA expression and microparticle shedding in these cells. In conclusion, PMF are key cells in hepatic vascular remodeling. They signal to endothelial cells *via* VEGFA-laden microparticles and act as mural cells for newly formed vessels, driving scar progression from portal tracts into the parenchyma.

Fibrosis and tissue remodeling in the liver lead to cirrhosis. Rappaport *et al.* were the first, 30 years ago, to assert that the development of a collateral circulation was determinant in the formation of cirrhotic nodules (1). Subsequent studies showed that liver fibrogenesis was invariably accompanied by intense vascular proliferation, and that both processes caused the remodeling of the liver architecture that leads to cirrhosis (2-4).

Myofibroblasts are the effector cells of fibrosis in all fibrotic diseases. They are matrix-producing cells characterized by contractile properties and *de novo* expression of proteins shared with smooth muscle cells, notably alpha-smooth muscle actin (α -SMA) (5, 6). Strong evidence indicates that they primarily arise from resident mesenchyme-derived cells (7). Hepatic stellate cells (HSC) were the first liver cell type to be identified as a source of myofibroblasts in the injured liver (8). HSC are usually recognized in their quiescent state on the basis of their vitamin A-containing lipid droplets (8). HSC play an important role not only in fibrogenesis, but likely also in the increased wall coverage, vasoconstriction and remodeling of the sinusoids involved in portal hypertension (2, 4, 9-11). Culture studies and *in situ* studies of fibrotic livers have indicated that portal mesenchymal cells distinct from HSC could give rise to a population of myofibroblasts, that we refer to as portal myofibroblasts (PMF) (6, 12-17). However the role of PMF remains poorly defined due to a lack of markers clearly distinguishing this cell population from HSC at the stage of myofibroblasts.

In virtually all chronic liver diseases, including those in which the primary insult is intralobular or perivenular, such as alcoholic or non-alcoholic fatty liver diseases, fibrotic scars expand from the portal tracts. This evolution pattern contrasts with the intralobular location of HSC and suggests an important role of PMF. In further support of PMF

implication, the progression of liver fibrosis to advanced stages is commonly associated with the proliferation of ductular cells expanding from the portal area together with the vascular proliferation. In the present study, we investigated the potential participation of PMF to liver angiogenesis. We specifically addressed the contribution of microparticles, *i.e.* extracellular submicron membrane vesicles that were recently shown to regulate angiogenesis (18). On the basis of pangenomic transcriptome analyses, we identified collagen, type XV, alpha 1 (COL15A1) as a marker of PMF. This new marker allowed us to demonstrate that PMF accumulated according to a perivascular distribution in cirrhotic liver. We report that PMF promote angiogenesis by interacting with endothelial cells *via* vascular endothelial growth factor A (VEGFA)-containing microparticles, and that this effect is amplified by cholangiocytes. These results clearly implicate PMF in the vascular changes associated with cirrhosis.

METHODS (also see supplemental methods)

Cell models. Pre-established methods were used to isolate primary rat liver cells, including liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) (10). PMF and HSC-derived myofibroblasts (HSC-MF) were obtained in culture, as described (14, 16). PMF were used after one passage (P1), unless otherwise stated. Other models consisted of transformed sinusoidal endothelial cells (TSEC) (19), human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and normal rat cholangiocytes (NRC) (20). Conditioned medium was harvested from cells incubated with serum-free plain culture medium for 24 hours.

Microarray and RT-PCR analyses. PMF and HSC-MF preparations were subjected to comparative transcriptomic analyses at P1, with Codelink microarrays (Rat Whole Genome Bioarray, GE Healthcare, Amersham BioSciences). The microarray data were analyzed with *R* packages (<http://www.bioconductor.org/>). Significant differential expression was identified by imposing a 5% false discovery rate (FDR) threshold in the significance analysis of microarrays (SAM) selection procedure (21). RT-PCR was performed as described in supplemental methods (also see supplemental table 1).

Animal models. Male Sprague Dawley rats (200-250 g) underwent bile duct ligation (15), or received 1mL/kg CCl₄, in a 50% (vol/vol) olive oil solution *via* the gastric route, twice weekly, and were investigated 48 hours after the last administration (Supplemental figure 1). All animal procedures were approved by the institutional animal care and use department (DSV, Paris, Agreement N° 75-397).

Human tissue samples. Liver biopsy specimens were obtained from patients with primary biliary cirrhosis (n=20), at fibrosis stages F1-F2 or F3-F4 (22) or nonalcoholic fatty

liver disease (n=31), classified as simple steatosis, nonalcoholic steatohepatitis (NASH) without advanced fibrosis or NASH with advanced fibrosis (23). Surgical liver specimens were obtained from 5 additional patients with cirrhosis. Histologically normal liver (n=9) was obtained from subjects undergoing liver biopsy for unexplained liver test abnormalities or liver surgery for tumor resection.

Immunostaining. Serial paraffin-embedded human liver tissue sections were immunostained for α -SMA, COL15A1, CD31, cytokeratin 19 (CK19) or fibulin-2. Cell immunofluorescence for α -SMA, COL15A1, CD31, pan-cytokeratin or fibulin-2 was also performed.

Angiogenesis assays. Endothelial cell migration was assessed by a chemotaxis filter assay. Tube assays were performed with endothelial cells in monoculture or co-cultured with PMF. In co-culture experiments, the cells were first labeled with fluorescent cell tracker probes. Cell-cell interactions were analyzed by video-microscopy and electron microscopy. Angiogenesis was investigated *in vivo* by Matrigel plug assays in wild-type and immunodeficient mice.

Microparticle analyses. Microparticles, identified as vesicles of 0.1 to 1 μ m in diameter, with phosphatidylserine accessible for annexin V binding on their surface, were assayed by flow cytometry, as previously described (24). Microparticles were extracted from conditioned medium by centrifugation followed by filtration through filters with 0.1 μ m pores (25). The effect of microparticles extracted from PMF-conditioned medium was tested directly on endothelial cells. In these experiments, microparticles were first labeled with a fluorescent cell tracker.

VEGF pathway analyses. VEGFA concentrations in PMF-conditioned medium were determined by DuoSet ELISA for rat VEGFA (R&D Systems). Vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) and phospho-VEGFR-2 (Tyr1175) were assayed by immunoblotting. For *Vegfa* gene silencing, PMF were transfected using Lipofectamine RNAimax, with either *Vegfa* SiRNA or a non targeting SiRNA (Life Technologies).

Statistics. Student *t* test was used for comparisons and Spearman's rank test to calculate correlation coefficients. A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Identification of COL15A1 as a marker of PMF

We used a PMF rat culture model that we previously established (14, 16). In this model, PMF are obtained by outgrowth from bile duct isolates, entirely free of HSC contamination, as ascertained by the absence of vitamin A auto-fluorescence (Figure 1A, a and a'). In culture conditions favorable to mesenchymal cells, myofibroblastic cells arise and proliferate intensely (Figure 1A, b-d). The resulting myofibroblasts, defined as PMF, are morphologically discernable (*e.g.* more elongated) from HSC-MF placed in the same culture conditions (Figure 1A, e-h). To identify a marker that would discriminate PMF from HSC-MF and other cell types in the liver, we compared the transcriptomic profile of PMF with that of HSC-MF. Cells were subjected to comparative transcriptomic analysis after one passage (P1), when both cell populations were fully differentiated into myofibroblasts and expressed α -SMA to the same level (Figure 1A, d and h; figure 1B), using pangenomic microarrays. The SAM procedure (21) identified 3,571 genes significantly more strongly expressed in PMF than HSC-MF (Supplemental table 2). Most previously reported markers of PMF or non-HSC-derived liver myofibroblasts as opposed to HSC-MF were recovered from this analysis, including fibulin-2, fibronectin 1 (26), gremlin 1 (27, 28), Thy-1 cell surface antigen (28), embigin, erythrocyte protein band 4.1-like 3 (27) and cofilin 1 (16) (Table 1). A new, more discriminant marker was also revealed, *i.e.* *Coll5a1*, which is strongly overexpressed in PMF relative to HSC-MF (Table 1 and supplemental table 2).

Next, we tested the specificity of COL15A1 for PMF. We previously showed that upon isolation, bile duct preparations, were mainly composed of CK19-positive epithelial cells (29). RT-PCR analyses of isolated bile ducts (Figure 1Aa), PMF in primary culture (P0)

(Figure 1Ac) and PMF at P1 (Figure 1Ad), showed that the mRNA levels of CK19 declined to undetectable levels, whereas those of *Coll5a1*, α -SMA and *Coll1a1* increased as PMF expanded in culture (Figure 1C). Unlike α -SMA, *Coll5a1* showed no further increase between P0 and P1 (Figure 1C), suggesting lesser up-regulation of COL15A1 compared to α -SMA during myofibroblastic differentiation. No significant amounts of *Coll5a1* mRNA were detected in any of the other liver cell types including hepatocytes, LSEC, Kupffer cells, and quiescent or myofibroblastic HSC (Figure 1D). Double staining for COL15A1 and cytokeratin showed that soon after isolation, bile duct preparations contained small clusters of cells that were distinct from epithelial cells and expressed COL15A1 (Figure 1E). At later stages, COL15A1-expressing cells displayed a myofibroblastic appearance, while cytokeratin-positive cells became undetectable. All PMF at P1 were stained for both COL15A1 and α -SMA (Figure 1F), although the intensity of COL15A1 staining varied between individual cells (also see supplemental figure 2C, left upper panel). These analyses confirmed that COL15A1 was undetectable in HSC-MF (Figure 1F and supplemental figure 2C, right upper panel). We also performed experiments to determine how COL15A1 compared with fibulin-2, previously used marker of PMF (6, 26, 30, 31) . We confirmed by RT-PCR analyses that *Coll5a1* was more discriminant than fibulin-2 to distinguish PMF from HSC-MF (Supplemental figure 2A). As opposed to *Coll5a1*, fibulin-2 underwent up-regulation in PMF between P0 and P1 (Supplemental figure 2B), suggesting that it is also a marker of PMF myofibroblastic activation. Importantly, fibulin-2 protein was detected by immunostaining not only in PMF but also, with a different pattern, in HSC-MF (Supplemental figure 2C, right lower panel). These results validated the specificity of COL15A1 as a marker for PMF likely also expressed by their precursor cells in the liver.

PMF expand according to a perivascular pattern in advanced fibrosis

We examined COL15A1 expression to determine how PMF evolve in injured livers and contribute to the progression of hepatic lesions. We found that *Coll5a1* transcript levels increased in the liver of rats following bile duct ligation (BDL) or CCL4 administration, used as models of biliary and hepatocellular-related fibrosis, respectively. The progression of fibrosis in these models was assessed by Sirius red staining (Supplemental figure 1). In both models, the expression of *Coll5a1* markedly increased at the stage of cirrhosis, *i.e.* after 6 and 8 weeks, respectively (Figure 2A, left panels). We analyzed liver tissue samples from patients with primary biliary cirrhosis (a disease of biliary origin) and those with nonalcoholic fatty liver disease (hepatocellular origin) to assess the involvement of PMF in human fibrotic liver disease. *COL15A1* expression was similar to that in controls, in samples from cases of primary biliary cirrhosis or nonalcoholic fatty liver disease with little or no fibrosis. However, in cases of extensive fibrosis or cirrhosis, *COL15A1* expression was substantially higher than in controls (Figure 2B, left panels). Both in experimental and human liver fibrosis, the expression of the endothelial cell marker, von Willebrand Factor (vWF) (32), was also increased in correlation with *COL15A1* expression (Figure 2, A and B, middle and right panels). This suggested a link between PMF accumulation and angiogenesis in the cirrhotic process.

Then, we determined the pattern of COL15A1 expression in human liver. Only rare COL15A1-immunoreactive cells were detected in the normal liver, consistent with the very low levels of *COL15A1* transcripts (Figure 3A). These immunoreactive cells were confined to the portal area, mainly around bile ducts and the peribiliary vascular plexus; they were also found adjacent to the canals of Hering, stained for CK19 (Figure 3A and supplemental figure

3) (33). In normal liver, perivascular smooth muscle cells, identified by α -SMA expression, and COL15A1-positive cells were clearly distinct (Figure 3A). Cirrhotic livers contained abundant COL15A1-immunoreactive cells that also expressed α -SMA (Figure 3, B and C). These cells, thus identified as PMF, were outnumbered by myofibroblasts of other type(s), and delineated CD31-labeled vascular lumens in capillaries located within fibrotic septa, often proximal to CK19-positive proliferative ductules, at the periphery of cirrhotic nodules (Figure 3, B and C). PMF and endothelial cells were intimately wrapped together around vascular lumens (Figure 3, B and C). Similar perivascular distributions of fibulin-2 and COL15A1 were found on serial sections of cirrhotic liver tissue, although the area of fibulin-2 staining was largely extracellular and exceeded that of COL15A1 (Supplemental figure 2D). We also performed flow cytometry analyses to verify that all CD31-positive endothelial cells were COL15A1-negative (not shown). Overall, these findings supported an important role of PMF in angiogenesis associated with cirrhosis formation.

PMF promote the formation of new vessels

We evaluated the effect of PMF on angiogenic functions of endothelial cells, using P1 PMF cultures, TSEC, primary rat LSEC and HUVEC. Using a chemotaxis filter assay, we found that the migration of TSEC was significantly increased by exposure to conditioned medium from PMF (Figure 4A), indicating that PMF may recruit endothelial cells for the formation of new vessels. Endothelial cells exposed to PMF-conditioned medium formed tubes that were longer and wider than those of cells exposed to control medium; this was true for TSEC (Figure 4B), primary LSEC and HUVEC (Supplemental figure 4, A and B). The capacity of PMF-conditioned medium to induce angiogenesis was also tested *in vivo*, using a Matrigel plug assay. Seven days after subcutaneous implantation in wild-type C57BL/6J mice, plugs prepared with control basal medium contained little or no vessel, whereas plugs

prepared with PMF-conditioned medium showed visible vessels (Figure 4C, upper panel). The concentration of hemoglobin, a surrogate of vascularization, was significantly higher in plugs prepared with conditioned medium than controls (Figure 4C, lower panel). Similar results were obtained in Rj:NMRI-*Foxn1tm/Foxn1tm* immunodeficient mice (data not shown). We tested the ability of PMF to form intercellular junctions with endothelial cells in co-culture. Tubulogenesis, as assessed by tube length and tube width, was greater in the co-cultures of TSEC with PMF than in cultures of TSEC alone (Figure 4D), and this effect increased with higher proportions of PMF (Figure 4E). The labeling of TSEC and PMF with different fluorescent cell trackers revealed that both cell types developed wrapping interactions and formed tubular networks in these co-cultures (Figure 4D and video-microscopy in supplemental material). They formed intercellular junctions with each other, as shown by electron microscopy. The junction structures consisted of closely apposed cell membranes with a narrowed intercellular space characteristic of gap junctions (Figure 4F, left panels). Other structures were observed including those composed of a thick inner dense plaque on the cytoplasmic face of each bordering cell, typical of desmosomes (Figure 4F, right panels). Gap junction communication between endothelial cells and mural cells has been shown to be critical for vascular maturation (34), whereas desmosomes provide mechanical stability by anchoring cytoskeletal intermediary filaments.

PMF signal to endothelial cells via VEGFA-containing microparticles

Microparticles are a sub-type of microvesicles, which also include exosomes and apoptotic bodies. They are extracellular vesicles, released by outward blebbing of the plasma membrane after externalization of phosphatidylserine; they can transfer bioactive molecules from one cell to another and thereby serve as vectors for intercellular exchange. Microparticles regulate the function of various target cell types, including endothelial cells

(18). Flow cytometry analyses demonstrated that PMF secreted microparticles, identified as vesicles of 0.1 to 1 μm in diameter, exposing phosphatidylserine (Figure 5A). Microparticles were extracted from PMF-conditioned medium and we confirmed by flow cytometry that the conditioned medium was thereby depleted of microparticles (Figure 5A). The depletion of microparticles from the PMF-conditioned medium significantly reduced its pro-angiogenic effects in TSEC tube assays and Matrigel plug assays (Figure 5B). Conversely, microparticles extracted from PMF-conditioned medium and added to TSEC in culture induced a significant increase in tubulogenesis, providing direct evidence of their pro-angiogenic effect (Figure 5C). Next, we addressed the contribution of the main angiogenic factor, VEGFA, to this effect. We found that microparticle depletion from PMF-conditioned medium caused a significant reduction of the VEGFA concentration (Figure 5D). This implies that the microparticles released by PMF carried VEGFA, such that VEGFA can be delivered to its receptor on target cells. To explore this possibility, microparticles were extracted from PMF-conditioned medium, labeled with a green fluorescent cell tracker and added to endothelial cells in culture. After 24 hours of incubation, cultured cells were washed and examined by confocal microscopy. The microparticles produced by PMF had adhered to endothelial cells (Figure 5E, left panel).

We also examined the activation status of VEGFR-2 (*i.e.* KDR), which mediates the pro-angiogenic effect of VEGFA in endothelial cells (35). Endothelial cells exposed either to PMF conditioned medium or to microparticles produced by PMF displayed VEGFR-2 activation, as attested by increased abundance of the proportion phosphorylated (Figure 5E, right panel). PMF were transfected with appropriate SiRNA to silence VEGFA: VEGFA production was effectively reduced, without affecting the release of microparticles by these cells (Supplemental figure 5, A-C). TSEC exposed to microparticles derived from VEGFA-silenced PMF formed significantly less tubes than those exposed to microparticles derived

from PMF transfected with scrambled-SiRNA (Figure 5F); this indicates that the effect of microparticles on tubulogenesis was, at least partly, mediated by VEGFA.

Cholangiocytes stimulate the angiogenic activity of PMF.

Newly formed vessels run together with proliferative ductules in the liver fibrotic septa (Figure 3, B and C), and this led to the idea that cholangiocytes may influence PMF-induced angiogenesis. To test this possibility, PMF were exposed to conditioned medium prepared from cultures of NRC. After 30 min, the medium was removed and cells were cultured for an additional 24 hours to generate PMF-conditioned medium. The stimulation of PMF by NRC increased their pro-angiogenic effect, measured as the response of endothelial cells to their conditioned medium in tube assays *in vitro* and Matrigel plug assays *in vivo* (Figure 6, A and B). By contrast, the conditioned medium from hepatocyte-stimulated PMF had no additional effect compared to that of unstimulated PMF on tubulogenesis (Supplemental figure 6). NRC-stimulated PMF displayed higher levels of *Vegfa* gene transcripts, secreted more VEGFA protein and produced more microparticles than unstimulated PMF (Figure 6, C-E). We infer from these results that cholangiocytes boost the pro-angiogenic effects of PMF through an increase in both VEGFA synthesis and microparticle formation.

DISCUSSION

In cirrhosis, the sinusoidal space ensuring blood supply to the parenchyma is decreased, whereas numerous and tortuous new vessels progress together with the fibrous repair process around the cirrhotic nodules and bypass the obstructed normal route (1, 2). This vascular proliferation contributes to the remodeling of the liver architecture, to collateral flow and to portal hypertension (1-4). In the present study, we show that the subpopulation of liver myofibroblasts referred to as PMF that arise from portal and periportal mesenchymal cells (6, 12-17), promote the formation of new vessels driving scar progression from portal tracts into the parenchyma.

On the basis of our culture model, we identified COL15A1 as a marker that distinguishes PMF from all other cell types in the liver, including HSC (either quiescent or myofibroblastic). Unlike α -SMA, COL15A1 seemed to be expressed in quiescent PMF precursor cells. Normal liver tissue contained very few COL15A1-positive cells, which were adjacent to the bile ducts and canals of Hering in the portal area. These COL15A1-positive cells proved able to become highly proliferative PMF, which accumulated at advanced stages of tissue damage, both in biliary (BDL and primary biliary cirrhosis) and hepatocellular types of liver disorders (CCL4 and NASH). This indicates that the contribution of PMF to fibrogenesis is not restricted to biliary fibrosis.

Previous studies demonstrated that COL15A1 provides stability and resilience to mechanical forces in the skeletal muscle and microvessels (36). This type of collagen also forms a proangiogenic matrix for endothelial cells (37). It has been found in continuous capillaries (38), and loss of its expression results in collapsed capillaries in mice (36). In

cirrhotic liver, COL15A1 was expressed together with α -SMA in cells thus identified as PMF that were outlining capillaries within large fibrotic septa. Likewise, fibulin-2, previously used as a marker of PMF (6, 26, 27, 30, 31) has been shown to co-localize with vWF along vessels running in the large septa of fibrotic livers (30). We also found a perivascular distribution of fibulin-2 in cirrhotic livers, although the area of fibulin-2 staining in these tissues was largely extracellular and more extensive than that of COL15A1. Possible explanations are that fibulin-2 is less specific for PMF and secreted more abundantly than COL15A1 and/or that COL15A1 is expressed at various levels in PMF, or may be restricted to sub-populations of PMF. The area of α -SMA staining also largely exceeded that of COL15A1 (Figure 3C, upper panels), which is consistent with a major contribution of HSC-MF to the entire population of hepatic myofibroblasts, as suggested by HSC fate tracing experiments in mice (39). The perivascular distribution of PMF suggested an active role of these cells in the formation of new vessels associated with cirrhosis. Proangiogenic properties of HSC-MF have also been previously reported (10, 11, 40, 41), although so far, no specific marker in addition to α -SMA, has been available to distinguish them from PMF *in vivo*, and thus determine their role, relative to that of PMF, in angiogenesis.

Looking into the mechanisms by which PMF triggered angiogenesis, we could show that PMF formed intercellular junctions with endothelial cells and acted as mural cells, currently viewed as central in the regulation of vascular formation and stabilization (34, 42). We also demonstrated that PMF signaled to endothelial cells through microparticles. In the absence of available method to specifically inhibit microparticle action, we performed experiments of microparticle depletion from PMF conditioned medium. These experiments indicated that the proangiogenic effect of PMF was largely although not exclusively mediated by microparticles. Several studies recently highlighted the role of microparticles in liver diseases (18, 25, 40). It was shown that liver cell-derived microvesicles composed of

exosomes and microparticles could incorporate Hedgehog ligands and induce Hedgehog-dependent changes in sinusoidal endothelial cells (40). Furthermore, in line with the present findings, it has been reported that skin myofibroblasts produced VEGF-containing microparticles able to stimulate endothelial cell growth (43). Here, we demonstrated that PMF microparticles contained VEGFA and activated VEGF signaling in endothelial cells. VEGF is the most important growth and survival factor for the endothelium. VEGF stimulates hepatic angiogenesis and fibrogenesis, and there is evidence to indicate that inhibiting the VEGF signaling pathway in the injured liver, reduces fibrosis progression, vascular remodeling and portal hypertension (3, 11, 44). While only part of the VEGFA secreted by PMF was incorporated in microparticles, we suggest that bioactive VEGFA was thereby concentrated and transferred from PMF to remote endothelial cells. In support of this possibility, microparticles induced intense activation of the VEGF receptor in endothelial cells. In addition, VEGFA silencing by SiRNA caused a significant decrease in the proangiogenic effect of PMF microparticles, although we cannot formally exclude that SiRNA itself was transferred by microparticles from transfected PMF to endothelial cells (45), and thereby inhibited VEGFA autocrine secretion.

We found that, *via* mechanisms yet to elucidate, cholangiocytes enhanced VEGFA expression and microparticle secretion by PMF. We used NRC, a model of cholangiocytes, which like cells of the ductular reaction have a proliferative phenotype as opposed to those in the normal liver (20). This capacity of NRC to boost pro-angiogenic PMF effects could account for the combined progression of proliferative ductules and vessels from portal tracts into the parenchyma. By releasing platelet-derived growth factor-BB, ductular cells may also stimulate the myofibroblastic differentiation, proliferation and migration of PMF (14), and also the maturation of newly formed vessels (46). Local tissue hypoxia, a well-established

triggering factor of angiogenesis, occurs as a result of microvascular disorders in liver diseases (3). Periportal areas are less likely to be exposed to extreme oxygen deprivation than perivenous areas, but it is likely that during disease progression, PMF migrate towards intralobular hypoxic areas. Of particular interest in this respect, we also found that hypoxia increased the expression of VEGF in PMF and enhanced PMF-induced endothelial tubulogenesis (not shown).

In summary (Figure 7), COL15A1-positive portal/periportal cells are triggered by the pathological microenvironment to proliferate and activate into PMF. Upon activation, including by ductular cells, PMF release VEGFA-laden microparticles that promote endothelial tubulogenesis. They also act as mural cells, developing close contacts and junctions such as gap junctions with endothelial cells, resulting in vessel maturation and stabilization. By these mechanisms, PMF can trigger the formation of scar vessels and thereby provide the backbone for the deposition of connective tissue and the formation of large fibrotic septa in the cirrhotic liver. We may therefore suggest that PMF are key cells in hepatic vascular remodeling and in the progression of the scar tissue that delineates cirrhotic nodules.

REFERENCES

1. Rappaport AM, MacPhee PJ, Fisher MM, Phillips MJ. The scarring of the liver acini (Cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983;402:107-137.
2. Onori P, Morini S, Franchitto A, Sferra R, Alvaro D, Gaudio E. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl₄-treated rats. *J Hepatol* 2000;33:555-563.
3. Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis* 2010;30:258-270.
4. Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J Hepatol* 2010;53:976-980.
5. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, De Wever O, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* 2012;180:1340-1355.
6. Lemoine S, Cadoret A, El Mourabit H, Thabut D, Housset C. Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832:948-954.
7. Duffield JS, Lupper M, Thannickal VJ, Wynn TA. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2013;8:241-276.
8. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008;88:125-172.
9. Housset C, Rockey DC, Bissell DM. Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:9266-9270.
10. Semela D, Das A, Langer D, Kang N, Leof E, Shah V. Platelet-derived growth factor signaling through ephrin-b2 regulates hepatic vascular structure and function. *Gastroenterology* 2008;135:671-679.
11. Thabut D, Routray C, Lomberk G, Shergill U, Glaser K, Huebert R, Patel L, et al. Complementary vascular and matrix regulatory pathways underlie the beneficial mechanism of action of sorafenib in liver fibrosis. *Hepatology* 2011;54:573-585.
12. Uchio K, Tuchweber B, Manabe N, Gabbiani G, Rosenbaum J, Desmouliere A. Cellular retinol-binding protein-1 expression and modulation during in vivo and in vitro myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells and portal fibroblasts. *Lab Invest* 2002;82:619-628.
13. Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Denef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol* 2002;36:200-209.
14. Kinnman N, Francoz C, Barbu V, Wendum D, Rey C, Hultcrantz R, Poupon R, et al. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Lab Invest* 2003;83:163-173.
15. Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, Dumont S, Rey C, Lienhart A, Housset C. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. *Lab Invest* 2007;87:292-303.
16. Bosselut N, Housset C, Marcelo P, Rey C, Burmester T, Vinh J, Vaubourdolle M, et al. Distinct proteomic features of two fibrogenic liver cell populations: hepatic stellate cells and portal myofibroblasts. *Proteomics* 2010;10:1017-1028.
17. Dranoff JA, Wells RG. Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology* 2010;51:1438-1444.

18. Lemoine S, Thabut D, Housset C, Moreau R, Valla D, Boulanger CM, Rautou PE. The emerging roles of microvesicles in liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:350-361.
19. Huebert RC, Jagavelu K, Liebl AF, Huang BQ, Splinter PL, LaRusso NF, Urrutia RA, et al. Immortalized liver endothelial cells: a cell culture model for studies of motility and angiogenesis. *Lab Invest* 2010;90:1770-1781.
20. Vroman B, LaRusso NF. Development and characterization of polarized primary cultures of rat intrahepatic bile duct epithelial cells. *Lab Invest* 1996;74:303-313.
21. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5116-5121.
22. Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1978;379:103-112.
23. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, Tordjman J, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* 2012;56:1751-1759.
24. Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, Binder BR, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:772-777.
25. Rautou PE, Bresson J, Sainte-Marie Y, Vion AC, Paradis V, Renard JM, Devue C, et al. Abnormal plasma microparticles impair vasoconstrictor responses in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2012;143:166-176 e166.
26. Knittel T, Kobold D, Saile B, Grundmann A, Neubauer K, Piscaglia F, Ramadori G. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 1999;117:1205-1221.
27. Ogawa T, Tateno C, Asahina K, Fujii H, Kawada N, Obara M, Yoshizato K. Identification of vitamin A-free cells in a stellate cell-enriched fraction of normal rat liver as myofibroblasts. *Histochem Cell Biol* 2007;127:161-174.
28. Dudas J, Mansuroglu T, Batusic D, Ramadori G. Thy-1 is expressed in myofibroblasts but not found in hepatic stellate cells following liver injury. *Histochem Cell Biol* 2009;131:115-127.
29. Kinnman N, Hultcrantz R, Barbu V, Rey C, Wendum D, Poupon R, Housset C. PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Lab Invest* 2000;80:697-707.
30. Piscaglia F, Dudas J, Knittel T, Di Rocco P, Kobold D, Saile B, Zocco MA, et al. Expression of ECM proteins fibulin-1 and -2 in acute and chronic liver disease and in cultured rat liver cells. *Cell Tissue Res* 2009;337:449-462.
31. Motoyama H, Komiya T, Thuy le TT, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Iwai S, et al. Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver. *Lab Invest* 2014;94:192-207.
32. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 2006;54:385-395.
33. Isse K, Lesniak A, Grama K, Maier J, Specht S, Castillo-Rama M, Lunz J, et al. Preexisting epithelial diversity in normal human livers: a tissue-tethered cytometric analysis in portal/periportal epithelial cells. *Hepatology* 2013;57:1632-1643.
34. Hirschi KK, Burt JM, Hirschi KD, Dai C. Gap junction communication mediates transforming growth factor-beta activation and endothelial-induced mural cell differentiation. *Circ Res* 2003;93:429-437.

35. Kanno S, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K, Tabayashi K, et al. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene* 2000;19:2138-2146.
36. Eklund L, Piihola J, Komulainen J, Sormunen R, Ongvarrasopone C, Fassler R, Muona A, et al. Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1194-1199.
37. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2003;3:422-433.
38. Muona A, Eklund L, Vaisanen T, Pihlajaniemi T. Developmentally regulated expression of type XV collagen correlates with abnormalities in Col15a1(-/-) mice. *Matrix Biol* 2002;21:89-102.
39. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, Pradere JP, et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun* 2013;4:2823.
40. Witek RP, Yang L, Liu R, Jung Y, Omenetti A, Syn WK, Choi SS, et al. Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells. *Gastroenterology* 2009;136:320-330 e322.
41. Taura K, De Minicis S, Seki E, Hatano E, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, et al. Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008;135:1729-1738.
42. Gaengel K, Genove G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:630-638.
43. Moulin VJ, Mayrand D, Messier H, Martinez MC, Lopez-Valle CA, Genest H. Shedding of microparticles by myofibroblasts as mediator of cellular cross-talk during normal wound healing. *J Cell Physiol* 2010;225:734-740.
44. Tugues S, Fernandez-Varo G, Munoz-Luque J, Ros J, Arroyo V, Rodes J, Friedman SL, et al. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007;46:1919-1926.
45. Wahlgren J, De LKT, Brisslert M, Vaziri Sani F, Telemo E, Sunnerhagen P, Valadi H. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Res* 2012;40:e130.
46. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;9:685-693.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Validation of COL15A1 as a marker of PMF

(A, B) Culture models of PMF and HSC-MF. Bile duct preparations and HSC were isolated from normal rat liver and placed in the same culture conditions on plastic. **A**) Photographs of the cells viewed by phase-contrast microscopy (a-h) or fluorescence microscopy under 328-nm UV excitation (a' and e') at the indicated time points. Bile ducts were isolated as clusters with no contamination by auto-fluorescent HSC (a and a'). In primary culture, PMF arose by outgrowth (b) and proliferated rapidly, before (c) and after one passage (d), forming highly elongated myofibroblastic cells (c and d). Immediately after isolation, HSC contained dense lipid droplets (e) characterized by auto-fluorescence (e'). In primary culture, HSC enlarged, their lipid droplet content decreased (f-g), and after one passage, they displayed a myofibroblastic appearance (h). **B**) HSC-MF and PMF, both at P1, equally express α -SMA, as assessed by immunoblotting; α -Tubulin was used as a loading control. The results of six independent cell isolates are shown. **(C-F)** *Col15a1* expression was analyzed: **C**) by RT-PCR, together with the expression of CK19, α -SMA and *Colla1*, in bile ducts freshly isolated from rat liver and in PMF outgrown from these preparations, in primary culture (P0) or at P1. The data are reported relative to values for mRNA levels in bile ducts and represent the means \pm SEM of 4-13 preparations; * $P < 0.05$ vs. bile ducts; ** $P < 0.05$ vs. bile ducts and PMF (P0); **D**) by RT-PCR, in various cell types derived from rat liver, including freshly isolated bile ducts, PMF at P1, quiescent HSC (qHSC), HSC-MF at P1, Kupffer cells, hepatocytes and LSEC. The data are reported relative to values for mRNA levels in HSC-MF (P1) and represent the means \pm SEM of 3-14 preparations; * $P < 0.05$ vs. other cell preparations; **E**) by double immunofluorescence with pan-cytokeratin (panCK) in bile duct preparations at different post-isolation times in culture, showing concomitant expansion of COL15A1-reactive cells and disappearance of the epithelial cells, with no

overlap between the two cell populations (z images representative of at least 6 independent cell preparations are shown) ;F) by double immunofluorescence with α -SMA in PMF and HSC-MF at P1, showing COL15A1 immunoreactivity in all α -SMA-positive PMF (P1), whereas such immunoreactivity was undetectable in α -SMA-positive HSC-MF (P1); bar scale: 50 μ m.

Figure 2. Combined PMF and endothelial cell accumulation in advanced liver fibrosis.

Hepatic expression of *COL15A1* and vWF, used as markers of PMF and endothelial cells, respectively, was measured by RT-PCR: (A) in liver tissue samples from bile duct-ligated and CCL4-treated rats at the indicated time points. The values reported are normalized to the values for mRNA in controls (*i.e.* sham-operated and vehicle-treated rats, respectively) and are means \pm SEM for 4-15 animals; and (B) in liver biopsy specimens from patients with primary biliary cirrhosis or nonalcoholic fatty liver disease, at different stages of disease. The values reported are normalized to the values for mRNA in controls with histologically normal liver and are means \pm SEM for 6-11 subjects; * $P < 0.05$ vs. controls. Correlations between *COL15A1* and vWF mRNA levels are shown in right panels.

Figure 3. Perivascular pattern of PMF accumulation in cirrhosis. (A, B) Serial tissue sections of normal and cirrhotic human liver were subjected to COL15A1, CK19, CD31 and α -SMA immunostaining. (A) In normal liver, rare COL15A1-immunoreactive cells (upper panel), shown by arrows and arrowheads on serial sections (left lower panels) were located in the portal area, adjacent to the bile ducts and canals of Hering (arrow and arrowheads, respectively), stained for CK19, and around the peribiliary vascular plexus, stained for CD31. They were distinct from vascular smooth muscle cells, stained for α -SMA.

(B) In cirrhotic liver, COL15A1-immunoreactive cells were detected in large numbers (upper panel); they were co-localized with α -SMA, mainly around thin-walled vessels stained for CD31 within large fibrotic septa. Their localization was proximal to CK19-stained ductular cells. **(C)** Double immunofluorescence was also performed in human cirrhotic liver, showing that COL15A1-reactive cells co-expressed α -SMA (upper panels) while the area of α -SMA staining exceeded that of COL15A1; COL15A1-reactive cells were proximal to CK19-positive ductules (middle panel), and wrapped around CD31-positive endothelial cells (lower panels); projections and a magnified z image (inset) are shown.

Figure 4. Pro-angiogenic interactions of PMF with endothelial cells. The angiogenic properties of PMF were investigated **(A-C)** by testing the effect of their conditioned medium (PMF-CM) **A)** on chemoattraction of TSEC in a chemotaxis filter assay. Endothelial cells that transmigrated through the filter in the presence of control medium or PMF-CM were stained with DAPI and counted under an epifluorescence microscope (n=15); **B)** on tube formation by TSEC. After incubation of TSEC in the presence of control medium or PMF-CM in a tube assay, tube length (----) and tube width (inset, ><) were measured under a phase-contrast microscope (n=7); **C)** on angiogenesis *in vivo*. C57BL/6J mice were given a Matrigel implant containing either control medium or PMF-CM, in each flank. After 7 days, the Matrigel plugs were explanted and the hemoglobin concentration was measured (n=15). Macroscopic views are representative of all explanted Matrigel plugs. **(D-F)** Angiogenesis was also analyzed by tube assays in co-culture, using different ratios of TSEC and PMF; TSEC monoculture served as a control and the same total number of cells was used in all conditions. **D)** Tubes were examined with a phase-contrast microscope for the determination of measures, or with a spinning disk microscope, for the visualization of TSEC and PMF labeled with red and green fluorescent cell trackers, respectively (n=5); **E)** Dose-dependent

effect of PMF proportion on tube formation in co-culture with TSEC (n=3); **F**) Tubes obtained with 1/4 PMF, were examined by electron microscopy demonstrating gap junctions (left) and desmosomes (right) between PMF and TSEC; scale bar without legend: 1 μm . Quantification of tubulogenesis was performed using photographs at x10 magnification. All quantitative data are shown relative to the relevant control values, arbitrarily set at 1 in each experiment, and represent means \pm SEM; * $P < 0.05$.

Figure 5. Effects of microparticles released by PMF in angiogenesis.

Microparticles were extracted from PMF-conditioned medium (PMF-CM) by centrifugation and filtration. **(A)** The presence of microparticles in PMF-CM and efficacy of the extraction procedure were ascertained by flow cytometry (n=12). **(B)** The pro-angiogenic effects of PMF-CM before and after the removal of microparticles were compared, by TSEC tube assay (left panel; n=7) and by Matrigel plug assay in C57BL/6J mice (right panel; n=7). **(C)** Microparticles extracted from PMF were resuspended in DMEM, and their effects were tested in comparison with control plain medium on tube formation by TSEC (n=3). **(D-F)** To test for the involvement of the VEGF pathway in the effect of microparticles: **D)** the concentrations of VEGFA were measured by ELISA in PMF-CM before and after the removal of microparticles (n=7); **E)** TSEC were incubated with microparticles previously labeled with a fluorescent green cell tracker. After 24 hours, the cells were labeled with anti-CD31 (red) and Draq5 nuclear marker (blue), and examined for microparticle entrapment with a confocal microscope, bar scale: 15 μm (left); cells incubated for 20 min with PMF-CM or PMF microparticles were subjected to (phospho)VEGFR-2 immunoblotting, using β -catenin as a loading control (right); **F)** PMF were transfected either with scramble or *Vegfa* SiRNA, and after 3 days, their microparticles were isolated by centrifugation and tested on TSEC in tube assays (n=5). All quantitative data reported are means \pm SEM; * $P < 0.05$.

Figure 6. Stimulation of PMF pro-angiogenic effects by cholangiocytes.

PMF were pre-incubated with the conditioned medium from NRC or control medium and the effects of the resulting conditioned media (PMF-CM (NRC+) and PMF-CM (NRC-)) were compared (A) on tube formation by TSEC in tube assays (n=6) and (B) on angiogenesis assessed by Matrigel plug assays in mice (n=20). PMF exposed or not exposed to NRC-conditioned medium were compared for (C) *Vegfa* expression, assessed by RT-PCR (shown relative to the mean value in (NRC-) cells; n=6); (D) VEGFA secretion, quantified by ELISA of the supernatant (n=7); (E) microparticle release, quantified by flow cytometry analysis of the cell supernatant (n=10). All quantitative data reported are means \pm SEM; * $P < 0.05$.

Figure 7. Model of PMF expansion and contribution to vascular remodeling in the fibrotic/cirrhotic liver.

The normal liver contains a small number of COL15A1-positive cells adjacent to the bile ducts and canals of Hering, in the portal area. In fibrotic liver, COL15A1-positive cells give rise to proliferative PMF. PMF signal to endothelial cells *via* VEGFA-laden microparticles and act as mural cells of the newly formed vessels. Thereby, PMF promote vascular remodeling and drive scar progression from portal tracts into the parenchyma, leading to the formation of cirrhotic nodules. The role of HSC-MF (not shown for clarity) in the process remains to be determined.

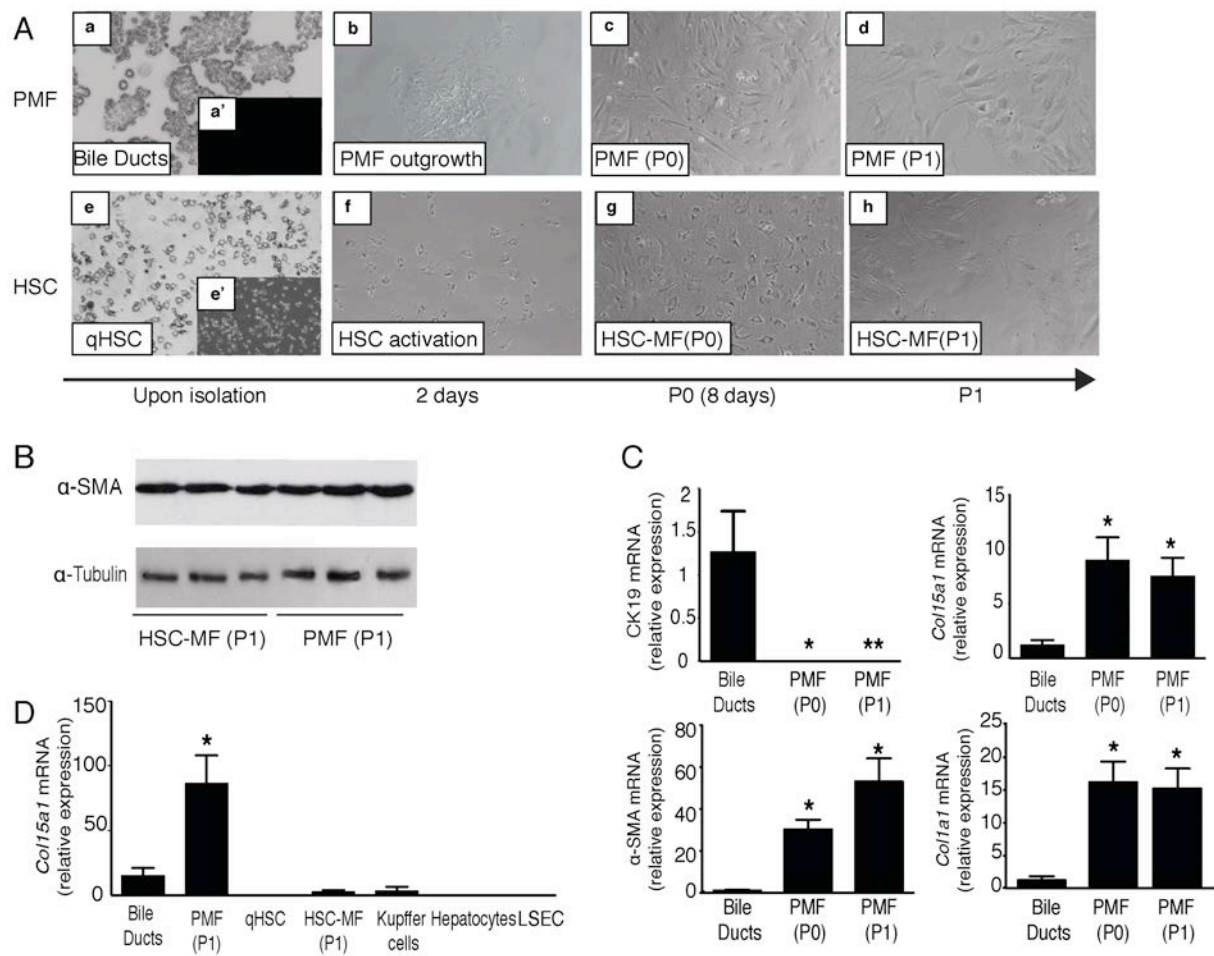


Figure 1

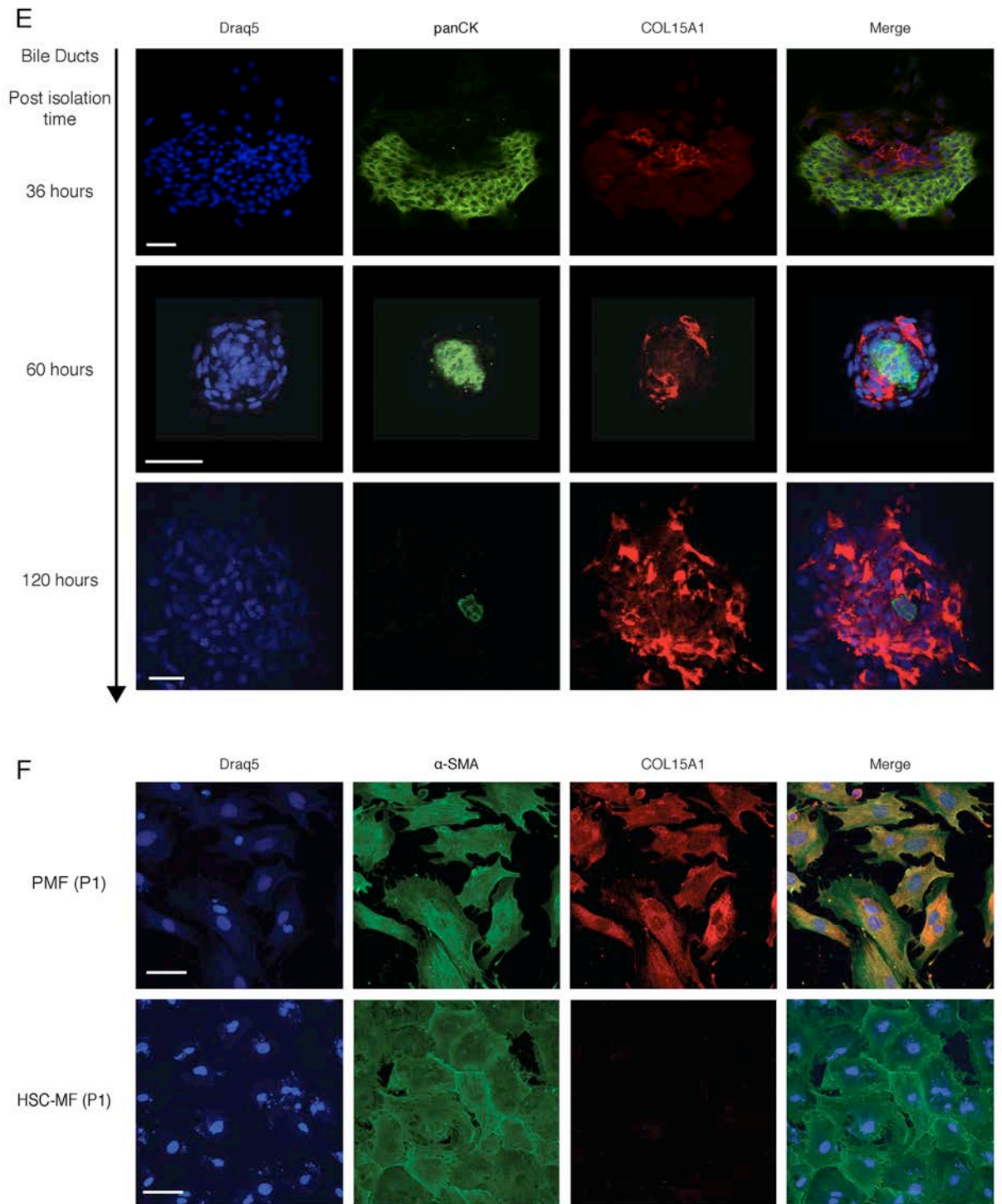


Figure 1

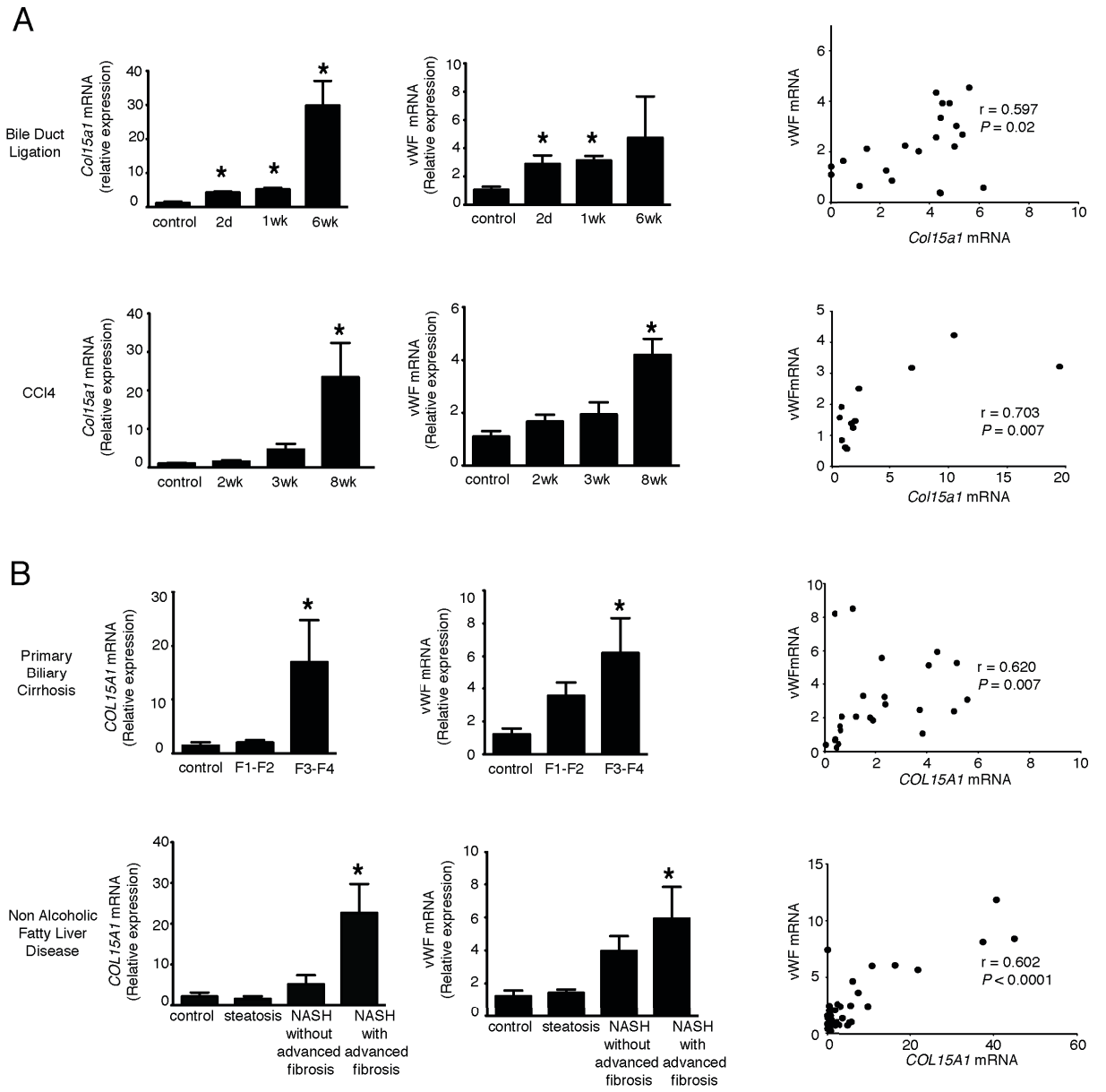


Figure 2

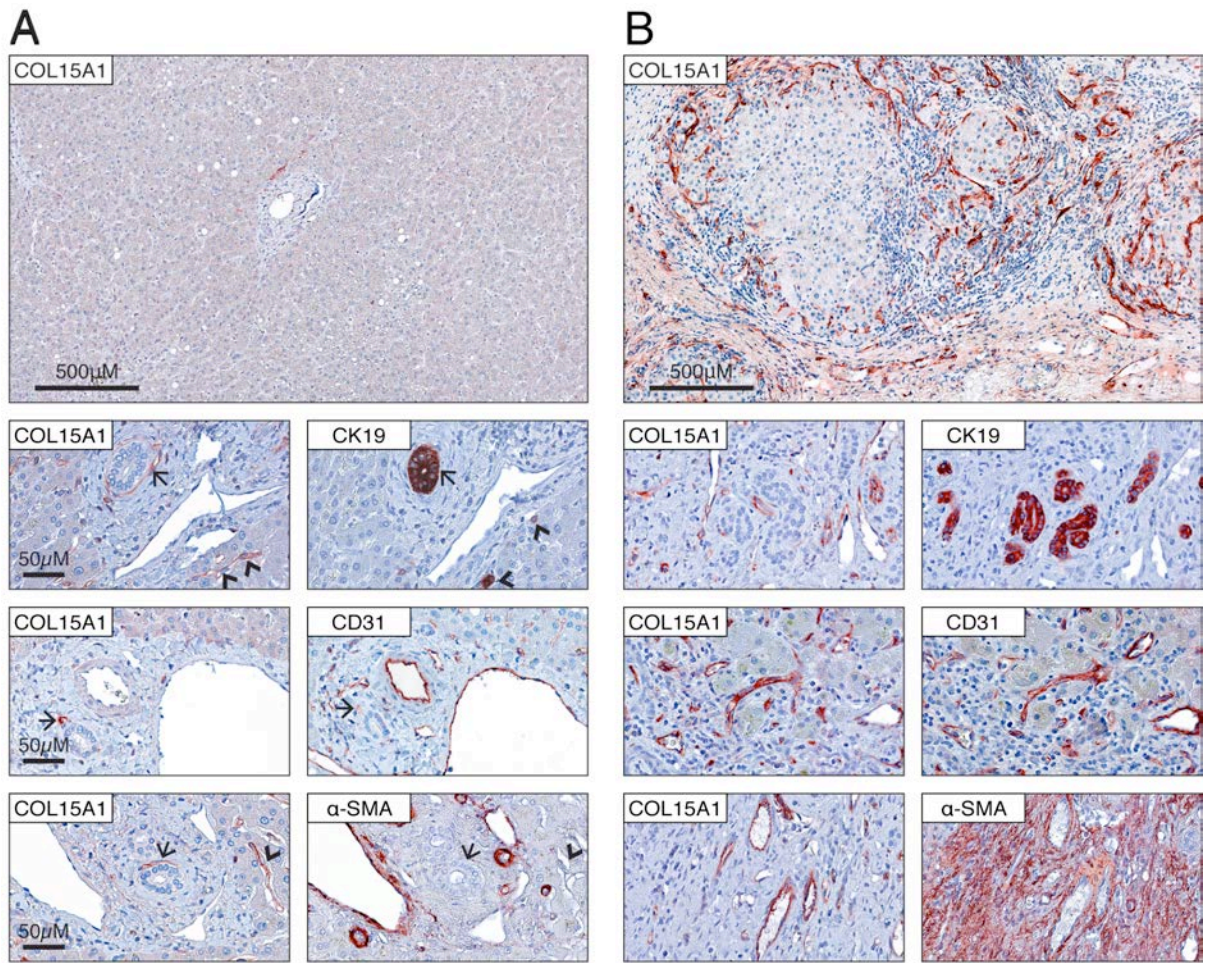


Figure 3

C

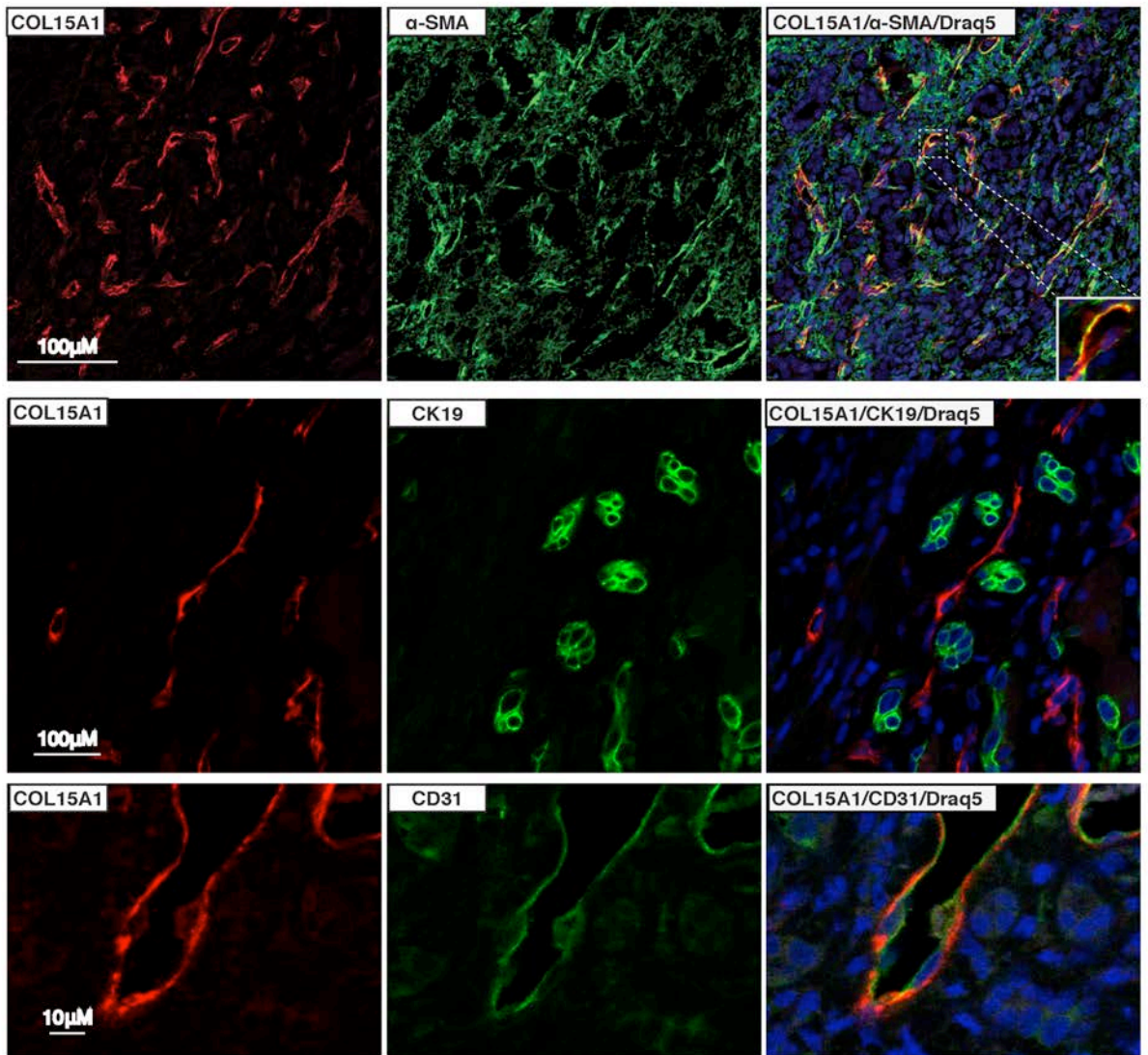


Figure 3

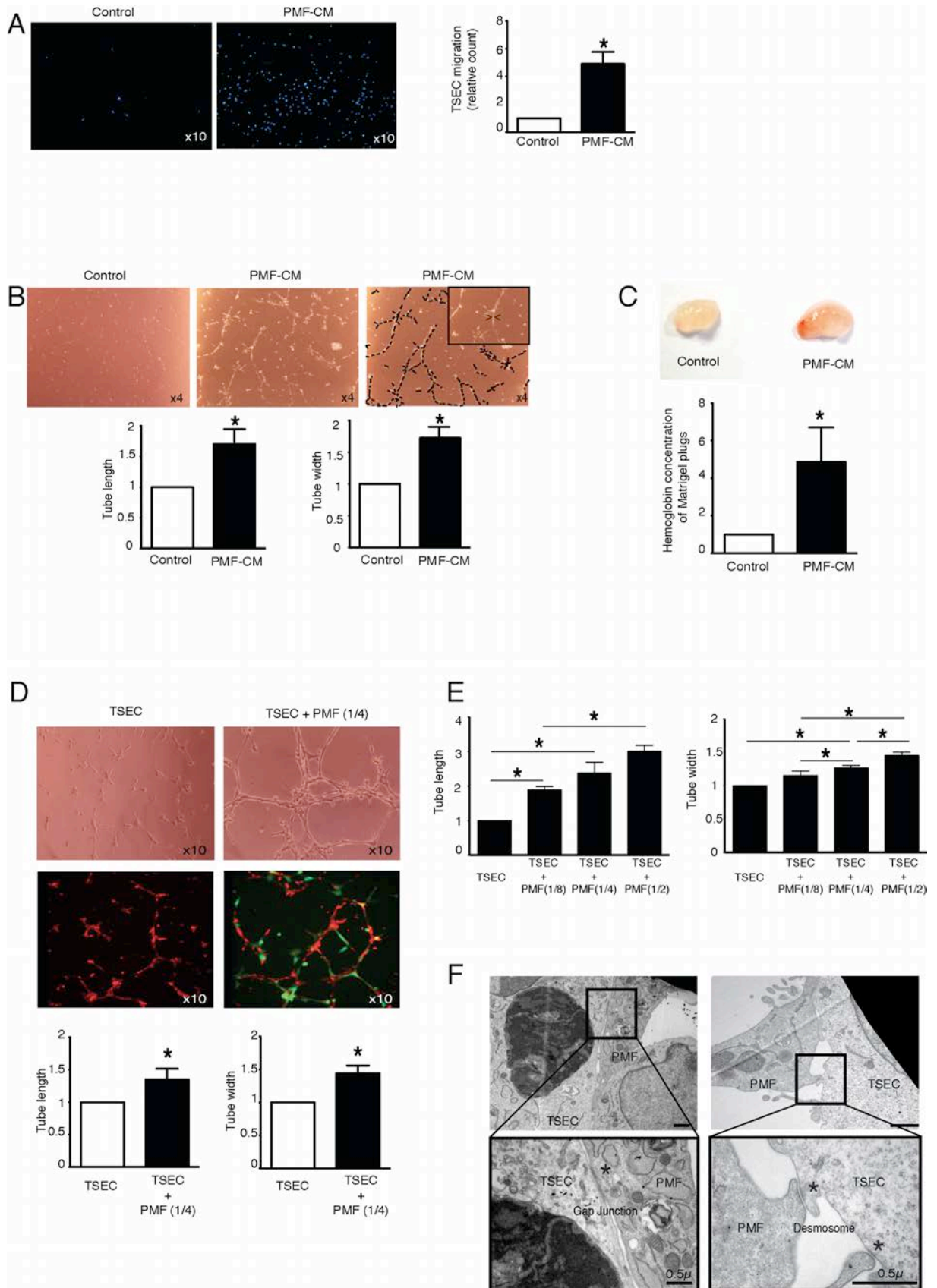


Figure 4

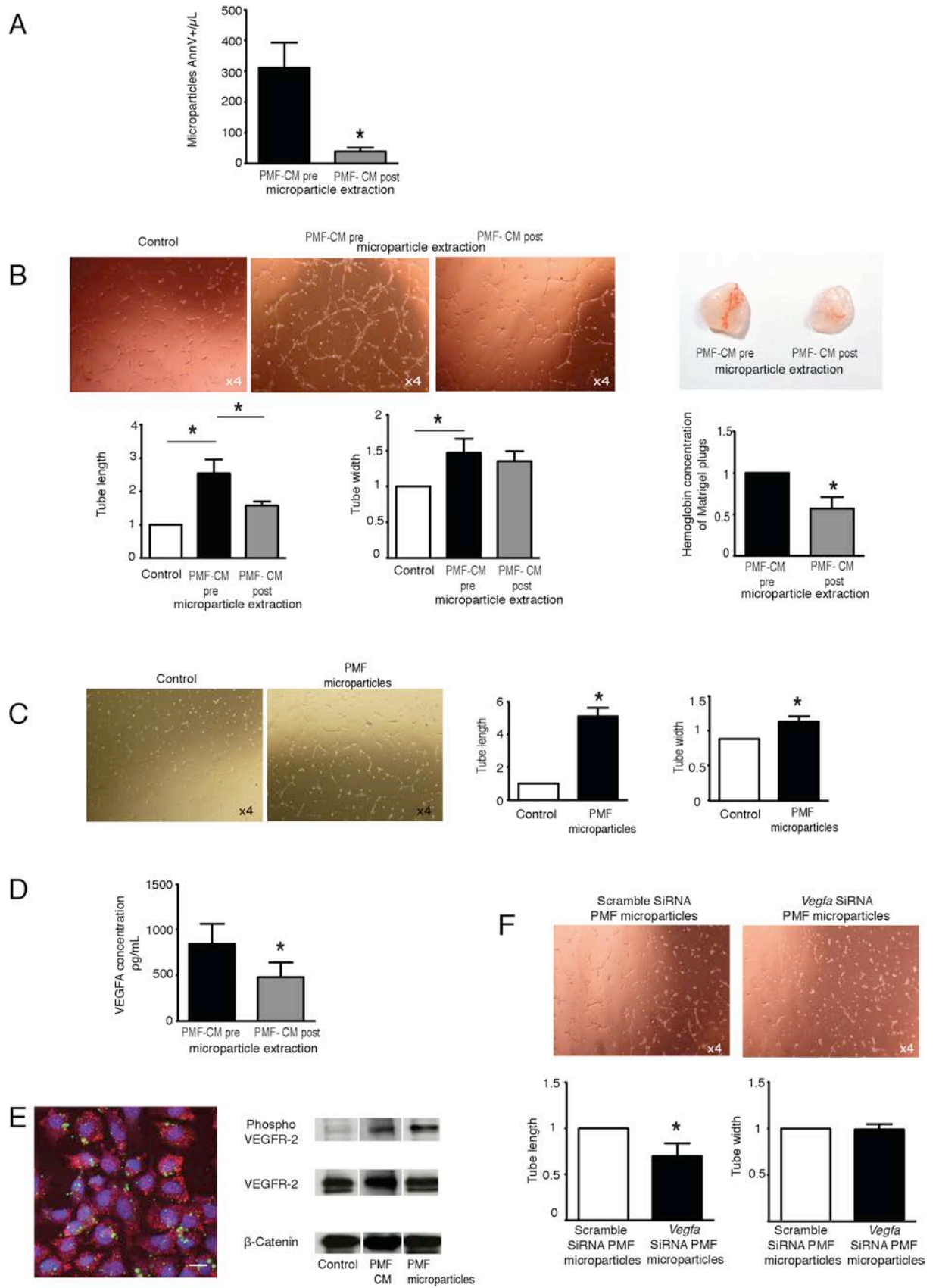


Figure 5

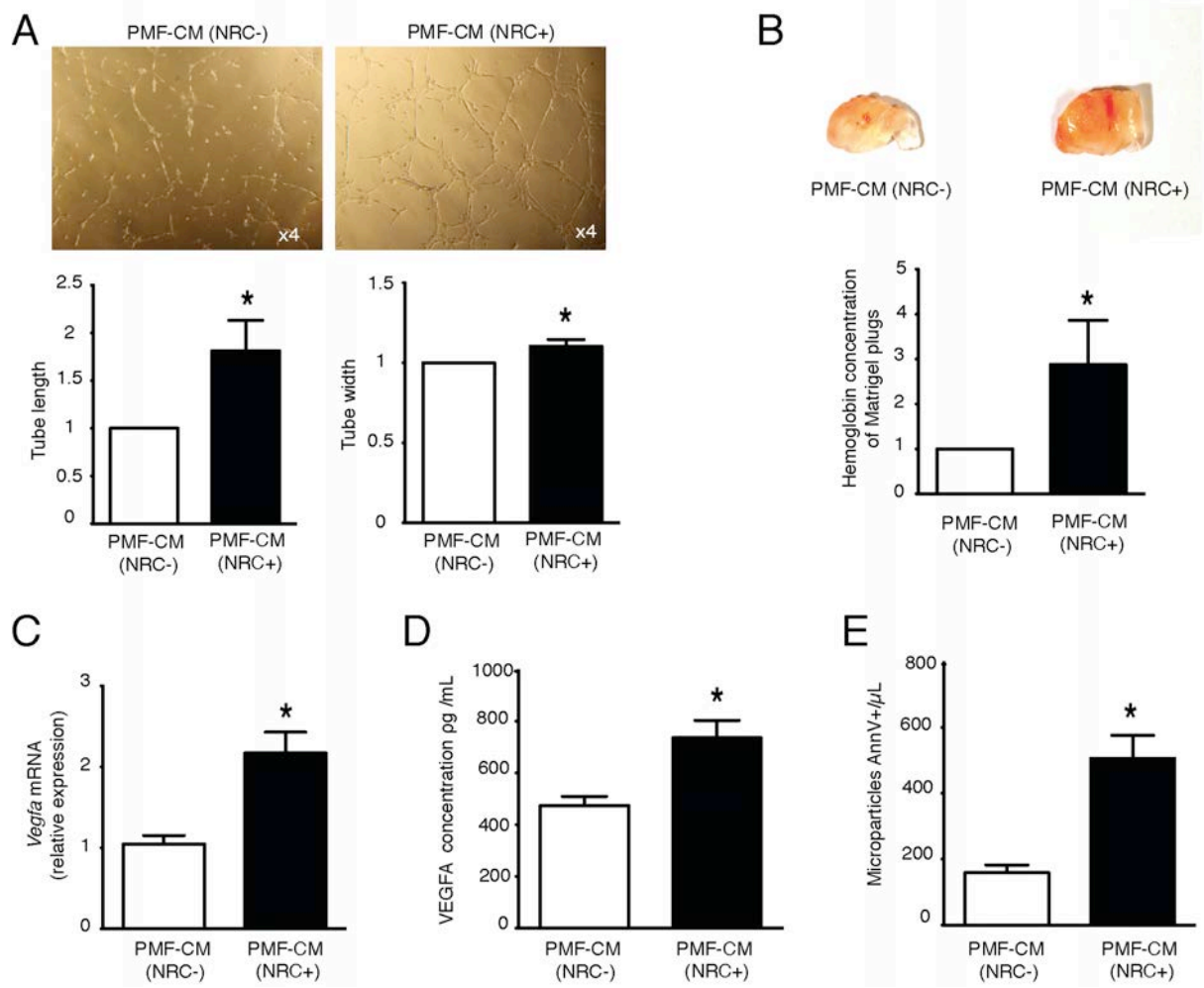


Figure 6

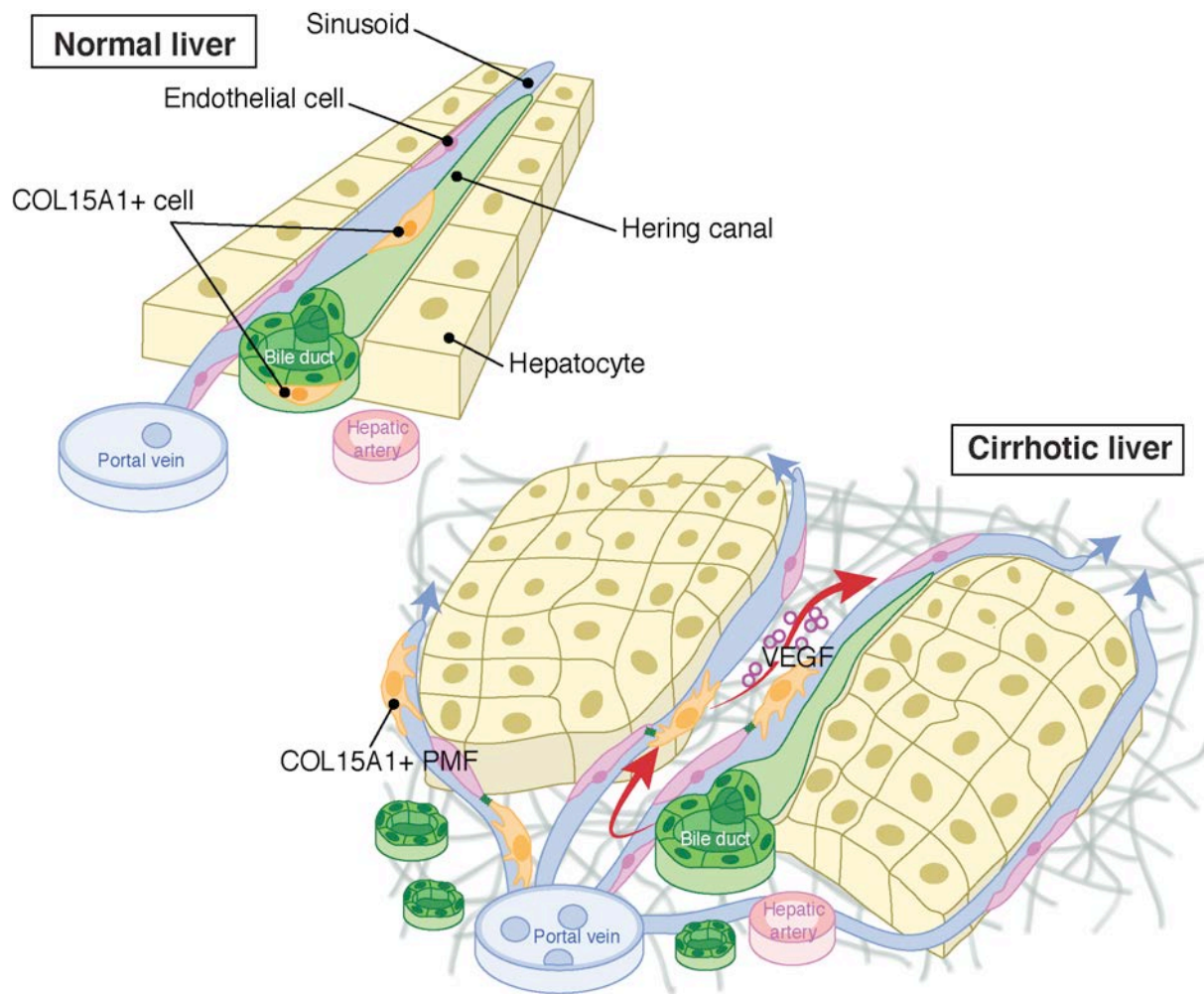


Figure 7

RÉSUMÉ

Dans les maladies chroniques du foie, l'angiogenèse et la fibrose sont étroitement liées. Nos précédents travaux ont permis de montrer que les myofibroblastes portaux (MFP) contribuaient de façon importante à la fibrogenèse hépatique. L'objectif de ma thèse était de déterminer si les MFP pouvaient aussi contribuer à l'angiogenèse hépatique. Nous avons identifié un nouveau marqueur spécifique des MFP, le collagène XV, grâce auquel nous avons pu mettre en évidence une prolifération des MFP dans des stades avancés de fibrose, à la fois dans des modèles animaux et chez les patients atteints d'hépatopathie chronique. Cette prolifération des MFP était corrélée à celle des cellules endothéliales. Dans le foie cirrhotique humain, les MFP présentaient une distribution périvasculaire, entourant les capillaires à proximité de la réaction ductulaire. L'effet des MFP sur les cellules endothéliales a ensuite été évalué par des tests d'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*. Le milieu conditionné des MFP augmentait la migration et la tubulogenèse des cellules endothéliales et stimulait l'angiogenèse dans les implants de Matrigel chez la souris. En co-culture, les MFP développaient des jonctions intercellulaires avec les cellules endothéliales et augmentaient la tubulogenèse. Nous avons montré que les MFP sécrétaient des microparticules contenant du VEGF-A, capables d'activer VEGFR-2 dans les cellules endothéliales et de médier leur effet pro-angiogénique. Enfin, les cholangiocytes étaient capables d'accroître l'effet pro-angiogénique des MFP. En conclusion, les MFP jouent un rôle clef dans le remodelage vasculaire associé à la fibrose hépatique.

Mots-clés : myofibroblastes portaux, angiogenèse, fibrose hépatique, collagène XV, cellule endothéliale sinusoidale, VEGFA

Portal myofibroblasts : angiogenic function and involvement in progression of liver fibrosis

ABSTRACT :

Liver angiogenesis and fibrogenesis are closely linked and most of studies have shown that angiogenesis could worsen fibrosis in chronic liver diseases. Our previous works have demonstrated that portal myofibroblasts (PMF) greatly contributed to liver fibrogenesis. The aim of this present work was to determine if PMF could also contribute to liver angiogenesis. We identified collagene XV (col15a1) as a new specific marker for PMF. In vivo, we observed PMF proliferation (measured by expression of col15a1) at advanced stages of fibrosis both in liver from animals models (CCl4 and BDL) and in livers from patients with chronic liver disease (primary biliary cirrhosis and non alcoolic fatty liver disease). PMF proliferation was correlated with endothelial proliferation. In human cirrhotic liver, PMF were located around vessels in fibrotic septa, in proximity to ductular reaction. PMF effects on endothelial cells were assessed in angiogenic tests *in vitro* and *in vivo*. PMF conditioned medium enhanced migration and tubulogenesis of endothelial cells and stimulated vascularization of matrigel plugs in mice. In coculture, PMF developed junctions with endothelial cells (desmosomes and gap junctions) and enhanced endothelial tubulogenesis. We showed that PMF secreted VEGFA containing microparticles, able to activate VEGFR-2 in endothelial cells and to mediate their angiogenic function. Cholangiocytes could increase PMF angiogenic properties by stimulating VEGFA expression and microparticles secretion. In conclusion, PMF, studied with a new marker, col15a1, are key cells in hepatic vascular remodeling.

Key words : portal myofibroblasts, angiogenesis, liver fibrosis, collagene XV, liver endothelial cell, VEGFA