



**HAL**  
open science

# Caractérisation des signaux de danger et de la signalisation cellulaire dans le développement de la fibrose hépatique

Sacha Robert

► **To cite this version:**

Sacha Robert. Caractérisation des signaux de danger et de la signalisation cellulaire dans le développement de la fibrose hépatique. Biologie cellulaire. Université de Rennes, 2016. Français. NNT : 2016REN1B016 . tel-01505338

**HAL Id: tel-01505338**

**<https://theses.hal.science/tel-01505338>**

Submitted on 11 Apr 2017

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

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

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

pour le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale VAS**

présentée par

**Sacha Robert**

Préparée à l'unité de recherche INSERM U991

Foie, Métabolismes et Cancer

UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

---

**Caractérisation des  
signaux de danger et  
de la signalisation  
cellulaire dans le  
développement de la  
fibrose hépatique**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 24 Mai 2016**

devant le jury composé de :

**Stanislas GRASSIN-DELYLE**

Maitre de conférence -Praticien Hospitalier  
Université de Versailles Saint-Quentin / *Rapporteur*

**Emmanuelle DEVARENNE-CHARPENTIER**

Professeur des universités  
Université de Reims / *Rapporteur*

**Isabelle COUILLIN**

Directeur de recherche  
Université d'Orléans / *Examineur*

**Nelly FROSSARD**

Directeur de recherche  
Université de Strasbourg / *Examineur*

**Odile SERGENT**

Professeur des universités  
Université de Rennes1/ *Président*

**Elisabeth BOICHOT**

Professeur des universités  
Université de Rennes1 / *Directrice de thèse*



# Sommaire

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Le foie</b> .....	<b>1</b>
<b>A- Anatomie du foie</b> .....	<b>1</b>
<b>B- Organisation du foie</b> .....	<b>2</b>
<b>C- Fonctions hépatique</b> .....	<b>3</b>
1- Métabolisme des glucides .....	4
2- Métabolisme des lipides .....	4
3- Métabolisme des protéines .....	4
4- Production de la bile hépatique .....	5
5- Détoxification .....	5
<b>D- Types cellulaires du foie</b> .....	<b>6</b>
1- Les hépatocytes .....	7
2- Les cellules endothéliales .....	8
3- Les cellules de Kupffer .....	8
4- Les cellules épithéliales biliaires (cholangiocytes) .....	8
5- Les progéniteurs hépatiques : cellules ovales .....	9
6- Les cellules étoilées .....	9
<b>Chapitre II : La fibrose hépatique</b> .....	<b>12</b>
<b>A- Généralités</b> .....	<b>12</b>
1- Epidémiologie .....	13
2- Principales étiologies de la fibrose hépatique .....	14
2.1- La maladie alcoolique du foie .....	14
2.2- L'hépatite virale B .....	14
2.3- L'hépatite virale C .....	15
2.4- Les stéatopathies non alcooliques .....	15

3- Caractéristiques de la fibrose hépatique.....	16
4- Modèles d'étude.....	17
4.1- Modèles <i>in vivo</i> de fibrose hépatique.....	17
4.1.1- Modèles d'exposition à des xénobiotiques.....	17
4.1.2- Modèles basés sur des régimes alimentaires spéciaux.....	20
4.1.3- Modèles de cirrhose biliaire secondaire.....	22
4.1.4- Modèles animaux génétiquement modifié.....	22
4.1.5- Modèles infectieux.....	24
4.2- Modèles <i>in vitro</i> de fibrose hépatique.....	25
4.2.1- Les cellules étoilées du foie en culture primaire.....	25
4.2.2- Les lignées cellulaires.....	26
4.2.3- Co-cultures.....	32
4.2.4- Tranches de foie.....	33
5- Diagnostique.....	33
6- Les traitements de la fibrose.....	37
6.1- Elimination des facteurs étiologiques.....	38
6.2- Thérapies anti-inflammatoires et immunosuppressives.....	38
6.3- Inhibition de l'activation des CEF et de ses effecteurs.....	39
<b>B- Mécanismes cellulaires et moléculaires de la fibrose.....</b>	<b>41</b>
1- La phase inflammatoire : rôle des macrophages.....	42
2- Le développement de la fibrose : rôle des cellules étoilées du foie.....	45
2.1- Les cellules étoilées du foie dans la physiologie.....	45
2.1.1- Rôles dans le développement du foie.....	45
2.1.2- Métabolisme des rétinoïdes.....	45
2.1.3- Homéostasie de la matrice extracellulaire.....	45
2.1.4- Sécrétion de médiateurs.....	46
2.1.5- Métabolisme des médicaments et détoxification.....	48
2.2- Les cellules étoilées du foie dans la fibrose.....	48
2.2.1- Activation.....	48
2.2.2- La prolifération.....	49
2.2.3- La contraction.....	50
2.2.4- Dégradation de la matrice extracellulaire.....	50
2.2.5- La fibrogénèse.....	51

2.2.6- Le chimiotactisme .....	52
2.2.7- L'immunorégulation .....	53
<b>C- L'inflammasome.....</b>	<b>56</b>
1- Découverte de l'inflammasome.....	56
2- Les PRR.....	56
2.1- Les récepteurs <i>Toll-like</i> ou TLR.....	57
2.2- Les récepteurs Lectine de type-C ou CLR.....	58
2.3- Les récepteurs éboueurs ou <i>scavengers</i> .....	58
2.4- Les <i>Rig-like receptors</i> ou RLR.....	58
2.5- Les <i>Nod-like receptors</i> ou NLR.....	59
3- Transduction, activation et régulation de la signalisation de l'inflammasome.....	60
<b>Chapitre III : Rôle du microenvironnement inflammatoire dans le développement de la fibrose hépatique .....</b>	<b>65</b>
<b>A- Implication des macrophages dans le développement de la fibrose hépatique .....</b>	<b>65</b>
1- Rôle des macrophages dans l'homéostasie du foie.....	65
2- Hétérogénéité des macrophages et fibrose hépatique .....	66
3- Coopération entre les macrophages et les fibroblastes hépatique .....	68
<b>B- L'inflammasome dans les maladies du foie .....</b>	<b>70</b>
1- Maladies alcooliques du foie .....	70
2- Les stéatopathies non alcooliques .....	73
3- L'infection par le virus de l'hépatite C .....	76
4- Dommages hépatiques induits par le paracétamol .....	77
5- Dommages induits par l'ischémie-reperfusion .....	78
6- La fibrose hépatique.....	80
<b>C- Rôle de l'IL-1<math>\beta</math> dans les pathologies du foie.....</b>	<b>81</b>
<b>Objectifs .....</b>	<b>85</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>88</b>
<b>Chapitre I : Implication de l'inflammasome et de la signalisation de l'IL-1<math>\beta</math> dans le développement de la fibrose hépatique chez un modèle murin traité au CCl<sub>4</sub>.....</b>	<b>88</b>
<b>1- Contexte scientifique.....</b>	<b>88</b>
<b>2- Matériel et méthodes .....</b>	<b>89</b>
2.1- Traitements des souris .....	89
2.2- Etude histologique .....	90

2.2.1- Traitements des échantillons de foie.....	90
2.2.2- Coloration au rouge Sirius.....	90
2.3- Extraction d'ARN.....	90
2.4- Réaction de transcription inversée.....	91
2.5- Réaction de polymérisation en chaine quantitative en temps réel (q-PCR).....	91
2.6- Dosage immunologique ELISA.....	92
2.7- Etude statistique.....	92
<b>3- Résumé de la revue.....</b>	<b>93</b>
<b>4-Résultats complémentaires.....</b>	<b>94</b>
<b>5- Conclusion.....</b>	<b>100</b>
<b>Chapitre II : Effets de la stimulation inflammatoire directe de diverses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires sur l'activité des HSC, en comparaison aux effets anti-inflammatoires et pro-fibrotiques du TGF-<math>\beta</math>1.....</b>	<b>101</b>
1- Contexte scientifique.....	101
2- Résumé des principaux résultats.....	102
3- Conclusion.....	103
<b>Chapitre III : Rôle de l'activation de l'inflammasome dans les macrophages en co-culture avec des HSC, sur leurs activités fibrolytiques et fibrogéniques.....</b>	<b>104</b>
1- Contexte scientifique.....	104
2- Résumé des principaux résultats.....	105
3- Conclusion.....	106
<b>Discussion générale.....</b>	<b>107</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>117</b>
<b>Références.....</b>	<b>120</b>

## **Annexes**

## Liste des abréviations

<b>ABC</b>	ATP-binding cassette
<b>ADM</b>	Adrénomédulline
<b>ADP</b>	Adenosine di-phosphate
<b>ALD</b>	Alcoholic liver disease
<b>ASC</b>	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain
<b>ATP</b>	Adenosine tri-phosphate
<b>BDL</b>	Bile duct ligation
<b>bFGF</b>	Fibroblast growth factor
<b>BSC</b>	Cellule étoilée biliaire
<b>CARD</b>	Caspase activation and recruitment domain
<b>CCl<sub>4</sub></b>	Tétrachlorure de carbone
<b>CDA</b>	Choline deficient L-amino acid defined diet
<b>CEF</b>	Cellule étoilée du foie
<b>CFSC</b>	Cellules de stockage de lipide cirrhotique
<b>CHC</b>	Carcinome hépatocellulaire
<b>CLR</b>	C-type lectin receptor
<b>CTGF</b>	Connective tissue growth factor
<b>CYP</b>	Cytochrome P450
<b>DAMP</b>	Danger-associated molecular pattern
<b>DEN</b>	Diethylnitrosamine
<b>DF</b>	Death fold
<b>DMN</b>	Dimethylnitrosamide
<b>ERO</b>	Espèce réactive de l'oxygène
<b>ET-1</b>	Endothéline-1
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
<b>GdCl<sub>3</sub></b>	Chlorure de gadolinium
<b>GFAP</b>	Glial fibrillary acidic protein



<b>GFP</b>	Green fluorescence protein
<b>GST</b>	Glutathion transférases
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor
<b>HMGB1</b>	High-mobility group box 1
<b>hTERT</b>	Human telomerase reverse transcriptase
<b>ICR</b>	Imprinting control region
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IGF</b>	Insulin-like growth factor
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IL-1Ra</b>	Interleukin-1 receptor antagonist
<b>iNOS</b>	Nitric oxide synthase
<b>IP</b>	Intrapéritonéale
<b>IRAK</b>	IL-1 receptor-associated kinase
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LRR</b>	Leucine rich repeat
<b>MAP</b>	Mitogen-activated protein
<b>MCD</b>	Régime déficient en méthionine and choline
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>MMP</b>	Métalloprotéase
<b>MRP</b>	Multifrug-resistance related protein
<b>MSU</b>	Monosodium urate
<b>Myd88</b>	Myeloid differentiation primary response gene 88
<b>NAFLD</b>	Non alcoholic fatty liver disease
<b>NASH</b>	Non alcoholic steatohepatitis
<b>NAT</b>	N-acétyltransférases
<b>NFSC</b>	Cellule de stockage de lipide normale
<b>NLR</b>	Nod-like receptor
<b>NTCP</b>	Na <sup>+</sup> -Taurocholate cotransporting polypeptide
<b>OATP</b>	Organic anion-transporting polypeptide

<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular pattern
<b>PDGF</b>	Platelet derived growth factor
<b>PRR</b>	Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
<b>PYHIN</b>	Pyrin and HIN domain-containing
<b>RLR</b>	Rig-like receptor
<b>SMA</b>	Smooth muscle actin
<b>STAND</b>	Signal transduction ATPases with numerous domains
<b>SULT</b>	Sulfotransférases
<b>TAA</b>	Thioacetamide
<b>TGF</b>	Transforming growth factor
<b>TIMP</b>	Tissue inhibitor of metalloproteinase
<b>TIR</b>	Toll/IL-1 receptor
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>TSV40</b>	Antigène T du virus simien 40
<b>UGT</b>	UDP-glucuronosyltransférases
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>VHB</b>	Virus de l'hépatite B
<b>VHC</b>	Virus de l'hépatite C
<b>WT</b>	Wild-type



## Liste des figures

<b>Figure 1</b> - Représentation des faces supérieure et inférieure du foie .....	2
<b>Figure 2</b> - Organisation du lobule hépatique .....	3
<b>Figure 3</b> - Représentation de l'organisation cellulaire du foie dans les sinusoides .....	7
<b>Figure 4</b> - Origines des sous-populations de myofibroblastes hépatiques .....	11
<b>Figure 5</b> - Progression pathologique de la NAFLD : de la stéatose simple au carcinome hépatocellulaire .....	16
<b>Figure 6</b> - Principe de la sonde du Fibroscan .....	34
<b>Figure 7</b> - Système d'évaluation de la fibrose hépatique par la méthode Ishak et Metavir sur des coupes de foies après coloration au rouge Sirius .....	35
<b>Figure 8</b> - Progression et complications de la cirrhose du foie humain .....	37
<b>Figure 9</b> - Signalisations de l'activation des CEF et leur disparition lors des lésions hépatiques et de la résolution .....	55
<b>Figure 10</b> - Organisation des domaines des protéines de l'inflammasome .....	60
<b>Figure 11</b> - Mécanismes d'action de l'inflammasome .....	64
<b>Figure 12</b> - Analyse du dépôt de collagène dans les tissus de souris sauvages traitées au CCl <sub>4</sub> en aigu ou chronique .....	94
<b>Figure 13</b> - Analyse de l'expression de l'ARNm de l'IL-1 $\beta$ et de l'IL-18 dans les tissus de souris sauvages traitées au CCl <sub>4</sub> en aigu ou chronique .....	95
<b>Figure 14</b> - Comparaison du dépôt de collagène dans les tissus de foies de souris traitées ou non à la suramine, dans le modèle d'induction de fibrose hépatique au CCl <sub>4</sub> .....	96
<b>Figure 15</b> - Comparaison du dépôt de collagène entre les tissus de foies de souris sauvage ou déficientes pour NLRP3, IL-1R1, ou P2RX7, dans le modèle d'induction de fibrose hépatique au CCl <sub>4</sub> .....	97
<b>Figure 16</b> - Analyse de l'expression de l'ARNm de la MMP-2, du TIMP-1 et du collagène de type I dans les tissus de foies de souris sauvage ou déficientes pour NLRP3, IL-1R1, ou P2RX7, dans le modèle d'induction de fibrose hépatique au CCl <sub>4</sub> .....	98
<b>Figure 17</b> - Analyse de l'expression de l'ARNm de NLRP3 dans les tissus de foies de souris sauvage ou déficientes pour NLRP3, IL-1R1, ou P2RX7, dans le modèle d'induction de fibrose hépatique au CCl <sub>4</sub> .....	99



## **Liste des tableaux**

**Tableau 1** - Thérapies potentielles de la fibrose hépatique ..... **41**

**Tableau 2** - Sélection de déclencheurs de l'activation des inflammasomes ..... **62**



# **Introduction générale**



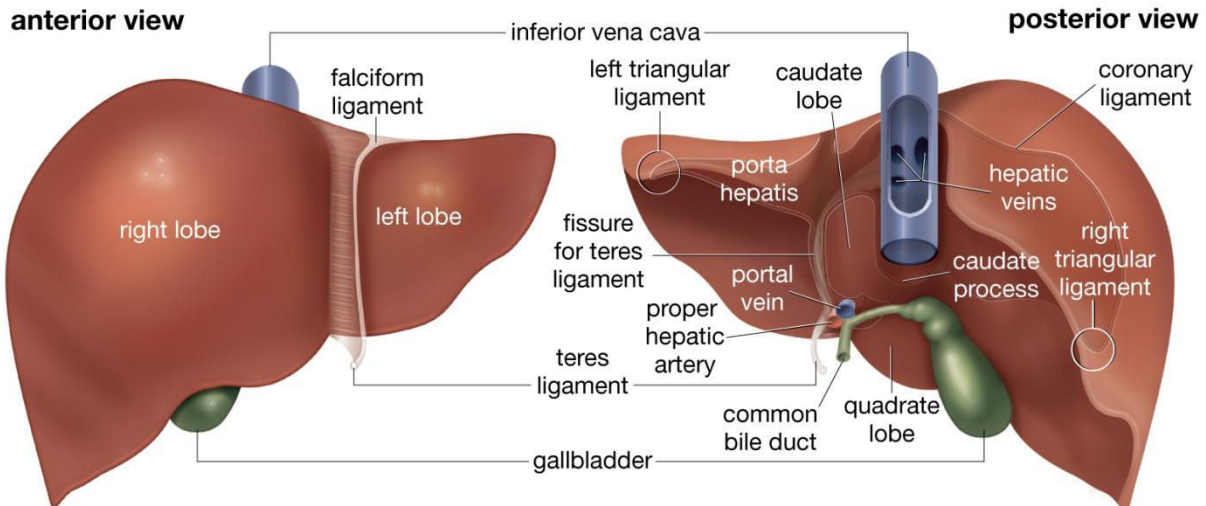


# Chapitre I : Le foie

## A- Anatomie du foie

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain, avec une architecture complexe et de nombreuses fonctions. Son poids correspond à 2 à 3% de la masse moyenne du corps pouvant peser jusqu'à approximativement 1,5 kg chez l'Homme. Il est situé dans le quadrant supérieur droit de la cavité abdominale sous l'hemi-diaphragme droit, protégé par la cage thoracique. Il s'étend plus loin à droite qu'à gauche de la ligne médiane du corps. Il est formé de 4 lobes dont les principaux sont le lobe gauche qui est le plus volumineux et le lobe droit qui est le plus étroit. Entre ces deux lobes majeurs, on distingue deux plus petits lobes correspondant au lobe caudé (ou lobe de Spiegel) et au lobe carré. Les lobes gauche et droit sont séparés par une bande de tissu appelée le ligament falciforme qui permet le maintien du foie au diaphragme. La vésicule biliaire est attachée au foie à la limite du lobe carré et du lobe hépatique droit. Le foie est recouvert d'une membrane de tissu conjonctif fibreuse appelée la capsule de Glisson (Walker, 1966). Au niveau de la partie inférieure du foie se trouve le hile hépatique qui sépare le lobe carré et le lobe caudé. C'est dans le hile que la veine porte et l'artère hépatique pénètrent dans le foie, et que passent des canaux biliaires majeurs (**Figure 1**).

Le foie est un des organes les plus densément vascularisés du corps humain. Il contient plus de 10% du volume sanguin total du corps, et il est traversé par 1,4 litre de sang en moyenne à chaque minute (pour un adulte). La vascularisation hépatique a la particularité d'être mixte, c'est-à-dire que le sang est fourni jusqu'au foie par deux voies différentes, correspondant à deux vaisseaux majeurs : l'artère hépatique et la veine porte. En pénétrant dans le foie, ces vaisseaux se divisent jusqu'à former un réseau très dense de vaisseaux extrêmement fins. Le sang apporté par l'artère hépatique provient de l'aorte et amène donc du sang oxygéné. Dans la seconde voie, le sang apporté par la veine porte provient de l'appareil digestif et est donc riche en nutriments. Environ 75% de l'apport sanguin au foie provient de la veine porte. L'artère hépatique et la veine porte se divisent au niveau du hile hépatique chacune en deux branches principales droite et gauche avec des ramifications. Le sang pénètre dans le foie par les sinusoides hépatiques (formés par des travées d'hépatocytes) qui se réunissent au centre d'un lobule hépatique pour former une veine centrolobulaire. Trois veines hépatiques, appelées sus-hépatiques, permettent le retour du sang vers le cœur et se jettent dans la veine cave inférieure.

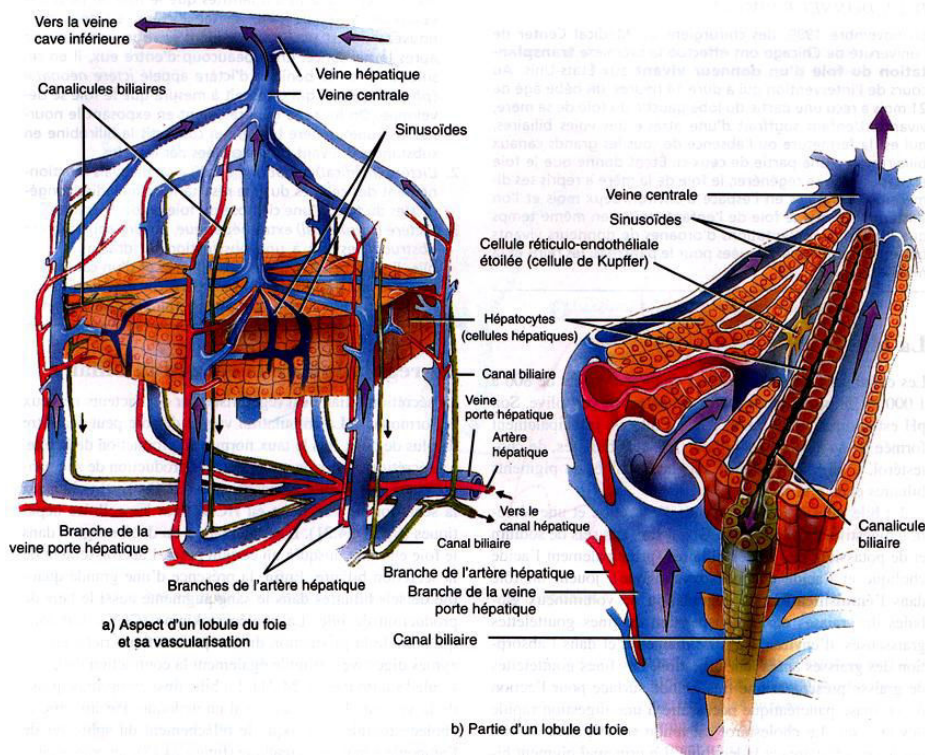


© 2010 Encyclopædia Britannica, Inc.

**Figure 1 - Représentation des faces supérieure et inférieure du foie.** Le foie est constitué de 4 lobes (gauche, droit, caudé et carré). Il est irrigué en sang par la veine porte et l'artère hépatique. Le canal hépatique permet la circulation de la bile jusqu'au duodénum (Encyclopædia Britannica, Inc, édition 2010).

## B- Organisation du foie

L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique. Le foie est constitué de millions de lobules hépatiques dont chacun contient plusieurs milliers de cellules hépatiques. Dans ces lobules, les cellules sont organisées en un arrangement spécifique qui permet les échanges entre le sang provenant de l'artère hépatique et de la veine porte, et les hépatocytes dans les sinusoides. Ces sinusoides se rejoignent au centre du lobule dans la veine centrolobulaire. Les lobules hépatiques sont délimités en périphérie par des espaces portes, qui sont des zones composées de l'artère hépatique, de la veine porte et d'un canal biliaire (**Figure 2**). Ces canalicules biliaires sont formés par les jonctions serrées latérales entre deux hépatocytes et collectent la bile produites par les lobules. Les hépatocytes possèdent également des desmosomes et des *gap junctions* permettant des échanges entre les cellules.



**Figure 2 - Organisation du lobule hépatique.** Le lobule est arrangé en travées d'hépatocytes entre lesquelles se trouvent les capillaires sinusoides. Ils se rejoignent au niveau de la veine centrolobulaire. En périphérie du lobule se trouvent les canalicules biliaires. L'espace porte est constitué de l'ensemble d'un canal biliaire, d'une branche de la veine porte et d'une branche de l'artère hépatique (Principes d'anatomie et de physiologie, Tortora-Grabowski de Boeck University, édition française).

### C- Fonctions hépatiques

Le foie assure de nombreuses fonctions très variées dans l'organisme et qui participent à son bon fonctionnement. C'est l'organe majeur du métabolisme avec plus de 500 fonctions métaboliques. Il participe au métabolisme des lipides, glucides et des protéines plasmatiques et ses produits sont libérés dans la circulation sanguine, tels que le glucose, les facteurs de coagulation, ou l'urée. Le foie assure également une fonction de stockage du glycogène, des lipides, des vitamines liposolubles et des oligo-éléments, comme le fer. Enfin, il exerce un rôle capital dans la détoxification des agents toxiques endogènes ou exogènes, *via* ses capacités de biotransformation.

## 1- Métabolisme des glucides

L'une des fonctions du foie est de réguler la glycémie. Ainsi le foie stocke du glucose sous la forme de glycogène afin d'en libérer lors d'une période de jeûne et permettre le maintien d'une glycémie normale, jusqu'à la prochaine prise alimentaire, située entre 3,9 et 6,1 mmol/L de sang, ce qui correspond à 0,8 et 1 g/L. Le foie dispose de trois voies métaboliques :

- La glycogénogenèse : elle permet de stocker le glucose dans le foie sous la forme de glycogène. Elle est stimulée par l'action de l'insuline.
- La glycogénolyse : il s'agit d'une réaction de phosphopyrolyse du glycogène afin de le transformer en glucose et de réduire les stocks en glycogènes.
- La néoglucogénèse : c'est la synthèse du glucose à partir d'éléments non glucosidiques tels que les acides aminés et les carbohydrates.

## 2- Métabolisme des lipides

Le foie joue également un rôle important dans l'homéostasie des lipides et du cholestérol. Grâce à la réaction de lipogénèse, le foie et le tissu adipeux peuvent produire des acides gras à partir d'acétyl-coenzyme A et constituer des réserves de graisse. En cas de besoin énergétique, ces acides gras provenant de l'hydrolyse des triglycérides vont être oxydés en acétyl-coenzyme A afin de produire de l'énergie par le cycle de Krebs. Le foie est capable de synthétiser des phospholipides et du cholestérol, mais également de dégrader ce dernier en acides biliaires afin d'être éliminé. Il peut produire également des lipoprotéines qui vont pouvoir se lier aux phospholipides et au cholestérol et ces différents complexes (*Low-Density Lipoprotein*, *High-Density Lipoprotein*, *Very Low-Density Lipoprotein*) vont être soit transportés dans la circulation sanguine jusqu'à d'autres organes ou bien être excrétés dans la bile. Enfin le foie est le lieu de stockage des vitamines liposolubles telles que les vitamines A, D, K et E.

## 3- Métabolisme des protéines

Le foie est capable de recycler les acides aminés non utilisés par l'organisme. Par une réaction de catabolisme, ces acides aminés vont servir à reformer de nouvelles protéines (en grande majorité des enzymes) ou bien de les éliminer sous la forme d'urée. Le foie produit également la majorité des protéines plasmatiques telles que l'albumine, des transporteurs cellulaires, des inhibiteurs de protéases et des facteurs de coagulation.

#### 4- Production de la bile hépatique

Le foie est l'organe producteur de la bile qui est justement formée et sécrétée par les hépatocytes. Ce liquide contient de la bilirubine qui résulte à la fois de sécrétions et d'excrétions. Les produits de sécrétion sont les phospholipides, les immunoglobulines A et les acides biliaires. Les produits d'excrétion sont le cholestérol, les pigments biliaires (déchets provenant de la dégradation de l'hémoglobine des globules rouges) et les métabolites des xénobiotiques (substances étrangères à l'organisme), ainsi que des substances endogènes, qui pourront être excrétés vers les reins. Grâce à l'action des acides et sels biliaires, la bile permet de favoriser l'absorption des graisses par l'intestin. La bile est sécrétée en continu par le foie et stockée dans la vésicule biliaire, qui libère la bile dans l'intestin après un repas.

#### 5- Détoxification

La détoxification, ou la biotransformation, des xénobiotiques par le foie lui permet d'assurer un rôle protecteur de l'organisme. La biotransformation est un processus enzymatique se déroulant majoritairement dans le foie mais qui n'est cependant pas restreint à cet organe. Par ce procédé, la structure chimique des molécules est modifiée afin de les rendre solubles pour faciliter leur élimination. Il arrive parfois que cette transformation produise un métabolite plus toxique que le composé mère, la réaction est alors requalifiée en « bioactivation ». Le foie est doté d'un système enzymatique complexe permettant cette biotransformation qui se compose de trois phases distinctes qui se complètent.

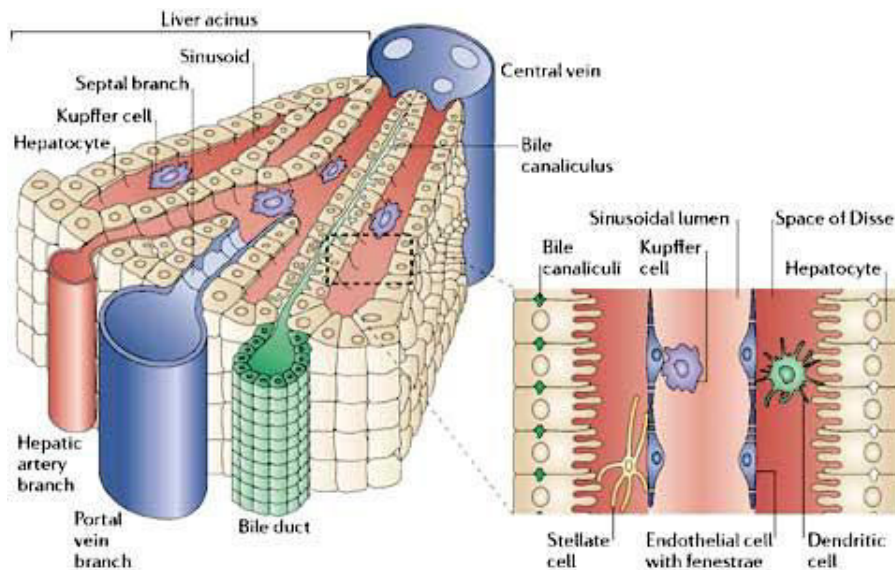
- Les enzymes de phase I vont permettre d'exposer ou d'ajouter des groupements fonctionnels à la molécule. Ces enzymes sont appelées les cytochromes P450 (CYP) et elles réalisent des actions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse (Iyanagi, 2007).
- Les enzymes de phase II vont utiliser les groupements réactifs exposés ou ajoutés par les CYP afin de catalyser des réactions de conjugaison telles la glucuronidation, la sulfonation, la méthylation, et la glutathionylation. Elles sont catalysées par des transférases, telles que les UDP-glucuronosyltransférases (UGT), sulfotransférases (SULT), les N-acétyltransférases (NAT), les glutathion transférases (GST) et des méthyltransférases (Jancova et al., 2010). Ces réactions vont faciliter l'excrétion des molécules cibles modifiées via les transporteurs membranaires tels que les *multidrug-resistance related proteins* (MRP).
- Les dernières enzymes, qui sont impliquées à la fois dans la première et la dernière phase du processus de biotransformation, sont les transporteurs membranaires qui

permettent d'une part l'absorption des xénobiotiques du sang vers l'hépatocyte, puis son excrétion après biotransformation, dans la bile ou l'urine. Les transporteurs d'influx sont constitués du *Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP) et du *organic anion-transporting polypeptide* (OATP), et les transporteurs d'efflux sont de la famille de *l'ATP-binding cassette* (ABC), tels des MRP, et la P-glycoprotéine.

#### **D- Types cellulaires du foie**

Environ 60% du contenu cellulaire du foie est représenté par des hépatocytes. Les autres types cellulaires sont les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer (ou macrophages résidents du foie), les fibroblastes (appelés communément « cellules étoilées »), les cellules épithéliales biliaires et les cellules ovales (des progéniteurs hépatiques).

Dans l'unité fonctionnelle du foie, le lobule hépatique, les hépatocytes sont arrangés en travées de cellules monocouches avec les capillaires sinusoides orientés sur chaque face, leur permettant d'avoir des échanges avec le sang via l'espace de Disse (pôles sinusoidaux). Un pôle biliaire est formé par la présence de jonctions serrées entre deux hépatocytes voisins formant ainsi les canalicules biliaires. Leur pôle sinusoidal se caractérise par la présence de microvillosités permettant d'augmenter grandement la surface d'échange avec le sang (**Figure 3**).



**Figure 3 - Représentation de l'organisation cellulaire du foie dans les sinusoides.** La lumière sinusoidale est fenêtrée par des cellules endothéliales qui séparent les hépatocytes du sang. Entre cet endothélium et les hépatocytes se trouve l'espace de Disse qui contient des cellules dendritiques et des cellules étoilées. Dans le vaisseau sinusoidal se trouve les macrophages tissulaires du foie, appelés cellules de Kupffer (Adams and Eksteen, 2006).

### 1- Les hépatocytes

Les hépatocytes sont des cellules épithéliales volumineuses de 20 à 40  $\mu\text{m}$  de diamètre qui assurent la majorité des fonctions métaboliques du foie, constituant la majeure partie du parenchyme hépatique. Elles possèdent une forme polyédrique agencées en travées. Leur demi-vie est d'environ 200 jours pour le rat et 400 jours chez l'Homme (Macdonald, 1961), expliquant le caractère « quiescent » du foie avec un indice mitotique très faible dans des conditions physiologiques. On estime une moyenne de 1 division pour 20000 cellules (Koniaris et al., 2003). Le cytoplasme des hépatocytes est riche en réticulum endoplasmique, lysosomes et en mitochondries, le rendant éosinophile et finement granulaire et reflétant leur grande activité métabolique. L'hépatocyte est la cellule fonctionnelle exocrine et endocrine du lobule hépatique. Selon sa localisation lobulaire, l'hépatocyte présente des gradients métaboliques, comme par exemple un gradient croissant de l'expression des CYP de l'espace porte vers la zone centrolobulaire (Ratanasavanh et al., 1991). Les cellules qui sont proches des systèmes portes sont en relation avec du sang oxygéné et possèdent des fonctions oxydatives très actives (gluconéogenèse,  $\beta$ -oxydation des acides gras et synthèse du cholestérol), tandis que les hépatocytes proches de la veine centrolobulaire participent plus fortement à la glycolyse, la lipogenèse et la détoxification. Le noyau des hépatocytes est



généralement rond, occupant entre 5 et 10% du volume cellulaire total et possédant une forte activité transcriptionnelle. Chez l'Homme adulte, environ 50% des hépatocytes sont diploïdes (Seglen, 1997). Le rôle de ces polynucléations pourrait s'expliquer du fait de l'activité de détoxification importante des hépatocytes pour la protection contre les génotoxiques, en augmentant ainsi le nombre de copies des gènes disponibles (Duncan, 2013).

## 2- Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales qui longent les sinusoides possèdent de larges pores avec un diamètre de 0,1 à 0,3  $\mu\text{m}$ , ce qui leur permet de faire passer des molécules entre le sang et les hépatocytes (Cogger et al., 2010). Ces cellules étant de plus dépourvues de lame basale, les échanges y sont facilités. Cependant cette fenestration varie le long du sinusoides hépatique, avec des diamètres plus importants mais des pores moins nombreux dans la région centrolobulaire. Ces cellules présentent une forte activité de pinocytose et d'endocytose et participent ainsi à l'élimination des déchets présents dans le sang (Sørensen et al., 2012). Le principal facteur pour maintenir les cellules endothéliales dans un état différencié et fonctionnel est le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), principalement produit par les hépatocytes et les cellules étoilées (DeLeve et al., 2004).

## 3- Les cellules de Kupffer

Les cellules de Kupffer sont des macrophages présents dans la lumière des capillaires sinusoides ainsi qu'aux intersections de leurs ramifications, partiellement amarrées aux cellules endothéliales. Elles sont impliquées dans le métabolisme de divers composés ainsi que dans les réponses immunologiques et les réactions inflammatoires. Notamment, elles présentent des capacités accrues de phagocytose qui leur permettent de prendre en charge des substances étrangères qui arrivent de l'intestin avant de gagner la circulation générale. En association avec les cellules endothéliales, elles forment la première barrière pour capter les toxines provenant de la veine porte. De plus, elles participent à l'homéostasie hépatique en produisant, suite à leur activation, de grandes quantités de facteurs de croissance, de cytokines inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).

## 4- Les cellules épithéliales biliaires (cholangiocytes)

Les cholangiocytes sont des cellules épithéliales polarisées et cubiques qui forment les canaux biliaires, reposant sur une lame basale. Ces cellules, comme les hépatocytes, dérivent des

hépatoblastes et ont pour fonction de contrôler le flux biliaire ainsi que le pH en sécrétant de l'eau et des ions bicarbonates dans la lumière du canal. Le pôle basal est associé à la lame basale et le pôle apical se trouve au niveau de la lumière du canal biliaire. Ces deux pôles sont séparés par des jonctions serrées qui contribuent au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale.

#### 5- Les progéniteurs hépatiques : cellules ovales

Le foie adulte contient un compartiment de cellules souches situé dans les petites branches de l'arbre biliaire intra-hépatique. Ces cellules progénitrices bipotentes sont issues du canal de Hering situé entre les travées d'hépatocytes et les canaux biliaires. Elles sont d'origine intra ou extra-hépatique et ont la particularité de pouvoir se différencier soit en hépatocytes, soit en cellules épithéliales biliaires (Forbes et al., 2002; Sell, 2001) selon le microenvironnement et les facteurs de croissances auxquelles elles sont exposées. En réponse à des blessures hépatiques, ces cellules prolifèrent abondamment dans le foie et peuvent ainsi réparer le tissu lésé lorsque les hépatocytes ne sont plus fonctionnels et n'assurent plus leur division lors de la régénération (Libbrecht and Roskams, 2002).

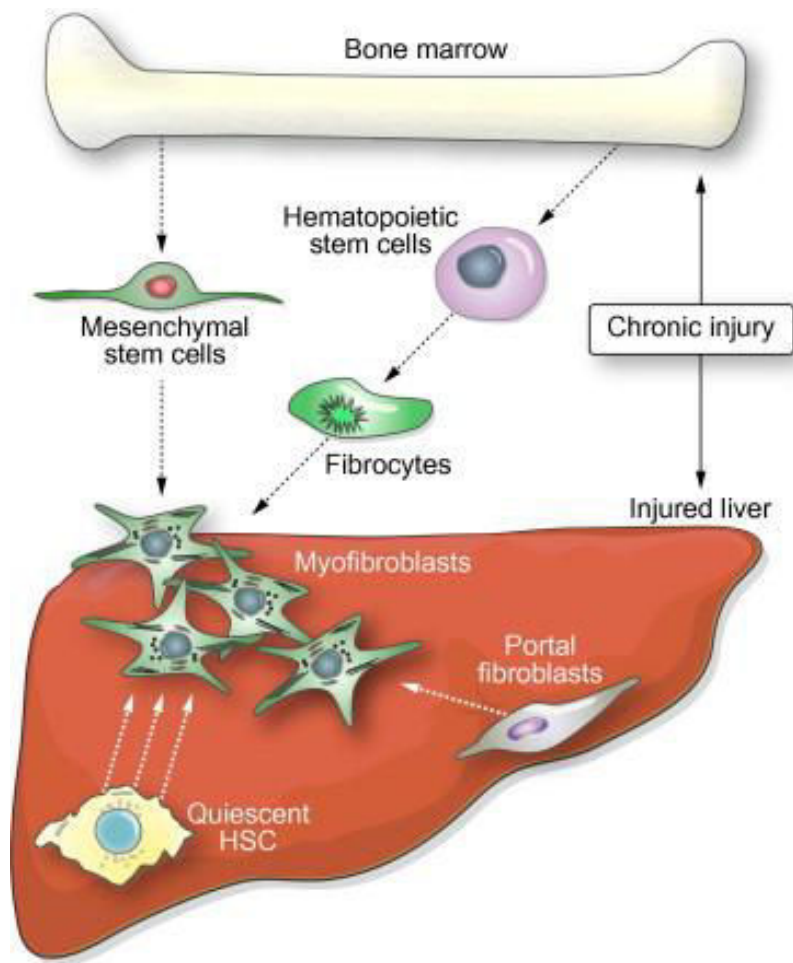
#### 6- Les cellules étoilées

Les cellules étoilées du foie (CEF), initialement connues sous le nom de « cellules de Ito », sont situées dans l'espace de Disse et leur activation constitue le phénomène central de la fibrogénèse. Elles sont apparentées aux péricytes et ont tout d'abord été décrites comme des cellules hépatiques étoilées par l'anatomiste Allemand Carl von Kupffer en 1876 puis ont été décrites comme des cellules de stockage de « gras » (*fat-storing*) par l'anatomiste Japonais Toshio Ito en 1951. Elles représentent environ 8% des cellules hépatiques. En conditions physiologiques, ces cellules sont à l'état quiescent et ont pour rôle principal de stocker la vitamine A sous la forme de rétinoïdes (Blaner et al., 2009). En effet, 50 à 80% des rétinoïdes totaux de l'organisme sont stockés dans le foie, dont 80 à 90% dans les cellules étoilées. Lors des pathologies inflammatoires chroniques du foie (causées majoritairement par les virus ou des toxiques), les cellules étoilées sont activées, perdent leurs vésicules de stockage de la vitamine A, développent leur appareil de Golgi et se transdifférencient en myofibroblastes, acquérant des propriétés de migration, de contractilité, de prolifération, de chimiotactisme et de fibrogénèse (Friedman, 2008a). Elles ont ainsi la capacité de se multiplier et de migrer vers les zones des lésions et d'y déposer de grandes quantités de matrice extracellulaire (MEC) afin d'induire la cicatrisation de ces lésions. Elles y produisent notamment des quantités

importantes de collagène de type I et de *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ 1, qui induisent des perturbations des fonctions hépatiques et de l'architecture du foie (Lee and Friedman, 2011), aboutissant au développement de la fibrose.

Les myofibroblastes hépatiques profibrotiques constituent une population hétérogène dans le foie ayant différentes origines cellulaires et des localisations tissulaires distinctes (**Figure 4**) :

- Les cellules étoilées du foie normal sont des cellules périsinusoïdales avec une origine embryologique encore incertaine, et qui assurent, en plus du stockage de la vitamine A, la synthèse des composants de la membrane basale située dans l'espace de Disse sous l'endothélium (Geerts, 2001).
- Les fibroblastes portaux sont localisés dans le tissu conjonctif des espaces porte et leur activation en myofibroblastes est en rapport avec des conditions ischémiques et dans le cas de la maladie cholestatique obstructive (Parola et al., 2008).
- Les cellules provenant de la moelle osseuse sont progressivement recrutées dans des conditions de dommages hépatiques chroniques (Forbes et al., 2004) et donnent des progéniteurs tels que les cellules souches mésenchymales (di Bonzo et al., 2008; Russo et al., 2006) et des fibrocytes circulants (Kisseleva et al., 2006) qui peuvent s'activer et se transdifférencier dans le foie malade en myofibroblastes.
- Les cholangiocytes et les hépatocytes dans les cas de maladies chroniques du foie, sont capables de passer d'un état épithélial à un état de cellules profibrogéniques grâce au processus de la transition épithélio-mésenchymateuse (Friedman, 2008b; Zeisberg et al., 2007). Ce processus a été décrit à l'origine dans le développement embryologique et fœtal et est impliqué dans l'invasion des cellules cancéreuses ainsi que le développement des pathologies inflammatoires et fibrogéniques chroniques de différents organes ou tissus (Lee et al., 2006).



**Figure 4 - Origines des sous-populations de myofibroblastes hépatiques.** La majorité des myofibroblastes proviennent de l'activation des CEF quiescentes. Il existe également une origine provenant des fibroblastes portaux, de la différenciation de progéniteurs provenant de la moelle osseuse (fibrocytes et cellules souches mésenchymateuses) et également de la transition épithélio-mésenchymateuse d'hépatocytes ou de cholangiocytes (non représentée ici) (Kisseleva and Brenner, 2012).



## **Chapitre II : La fibrose hépatique**

### **A- Généralités**

La fibrose est le résultat d'un processus de réparation tissulaire perturbé en réponse à des agressions le plus souvent répétées. Elle peut se déclarer dans de nombreux organes comme les poumons (fibrose cystique, fibrose pulmonaire idiopathique), la peau, le muscle squelettique, le cœur, le rein, la moelle osseuse, l'intestin (maladie de Crohn) ou encore le foie. Le processus de réparation physiologique devient pathologique lorsque la chronicité des atteintes génère une cicatrisation excessive qui altère la structure fonctionnelle de l'organe cible. Elle peut alors entraîner de graves complications pouvant conduire à la défaillance de l'organe. De nombreuses pathologies chroniques entraînant un processus fibrotique ont été recensées au niveau du foie. Ces pathologies sont de plus en plus fréquentes, en lien avec l'augmentation de la prévalence de l'hépatite B et de l'hépatite C mais également du fait des habitudes de consommation d'alcool et de nourriture grasse ou sucrée à l'origine des syndromes métaboliques et de l'obésité. La fibrose hépatique se pose donc aujourd'hui comme un véritable enjeu de santé publique, à la fois dans les pays en voie de développement et dans les pays industrialisés.

Le processus fibrotique implique des modifications quantitatives et qualitatives des composants de la MEC et une accumulation de tissu cicatriciel, constitué principalement par des fibres de collagène. La progression de la fibrose est plus ou moins rapide en fonction du contexte pathologique. C'est au dernier stade de son développement, connu sous le nom de cirrhose, qu'apparaissent les complications qui rendent la maladie du foie symptomatique. De manière plus précise, la fibrose hépatique est caractérisée par la perte de la fenestration endothéliale, la formation excessive de tissu cicatriciel dans l'espace de Disse et la présence de zones de septa fibrotique richement vascularisées qui signent une régénération anarchique des cellules du foie. Ces désorganisations de l'architecture du foie, associées à une perte de l'homéostasie cellulaire liée à l'apoptose hépatocytaire massive induisent une insuffisance hépatocellulaire et rénale, la formation d'ascite, une encéphalopathie (signe de la diminution de la capacité de détoxification du foie) et une hypertension portale. Le risque de développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) est alors élevé (Schuppan and Afdhal, 2008).

## 1- Epidémiologie

De début généralement insidieux, les signes cliniques de la fibrose apparaissent tardivement, le plus souvent après l'installation d'une cirrhose, c'est à dire à un stade avancé de fibrose (Poynard et al., 2000a). Dans la majorité des cas, la progression vers le stade cirrhotique se fait sur une période longue, de 15 à 20 ans. Les patients atteints d'une cirrhose peuvent rester libres de toutes complications pendant plusieurs années, on parle alors de cirrhose compensée et dans 40% des cas, elle est asymptomatique. Une cirrhose décompensée est associée à une espérance de vie courte, et dans ce cas, la transplantation hépatique reste la seule solution thérapeutique envisageable et efficace (Davis et al., 2003). L'incidence et la prévalence en forte augmentation de la cirrhose et du cancer primitif du foie permettent de comprendre l'importance de la prise en charge des maladies du foie dans le monde.

Une enquête réalisée aux Etats-Unis par les *Centers for Disease Control and Prevention* entre 1999 et 2010 a estimé que la prévalence de la cirrhose hépatique concernait 0,27% de la population (soit 633323 adultes) dont 69% n'étaient pas au courant d'être atteint d'une maladie du foie. Cette prévalence est plus élevée dans certaines communautés (origine ethnique, niveau de pauvreté, niveau d'éducation). Le diabète, la consommation excessive d'alcool, les hépatites virales C et B, le sexe masculin, et un âge avancé sont associés à la survenue d'une cirrhose. 53,5% des cas concernent des hépatites virales (surtout l'hépatite C), le diabète, et l'abus d'alcool.

Le taux de mortalité par cirrhose est de 26,4%, comparé à 8,4% chez des individus témoins (Scaglione et al., 2015). Une étude menée dans 187 pays entre les années 1980 et 2010 montre que la mortalité par cirrhose augmente pour passer d'environ 676000 morts (avec un intervalle d'erreur de 95% : 452863 à 1004530) en 1980 à plus d'un million de morts (670216 à 1554530) en 2010 (soit environ 2% du total global). En 2010, c'est l'Egypte, suivie par la Moldavie, qui avaient les taux de mortalité par cirrhose les plus élevés, 72,7 et 71,2 morts pour 100000 individus respectivement, tandis que l'Islande avait le taux le plus bas. En Egypte, pratiquement 1 mort sur 5 (18,1%) chez les individus masculins entre 45 et 54 ans était lié à une cirrhose hépatique (Mokdad et al., 2014). Dans une autre étude, il est avancé qu'environ 0,1% de la population européenne est affectée par une cirrhose, ce qui correspond à 14 à 26 nouveaux cas pour 100000 individus chaque année et environ 170000 morts par an (Zatoński et al., 2010). Le carcinome hépatocellulaire (qui concerne 70 à 90% des cas de cancers primaires du foie) est le 5<sup>ème</sup> type de cancer en Europe et l'une des plus sérieuses

complications de la cirrhose. Des données épidémiologiques européennes ont montré qu'il y a 1 à 13 nouveaux cas et 1 à 10 morts pour 100000 habitants en Europe. L'organisation mondiale de la santé estime que ce cancer est responsable de 47000 morts par an dans l'Union Européenne. En France, une étude a montré que la prévalence de la fibrose était de 1,3% et la cirrhose de 0,3% dans une population constituée à 95% d'hommes âgés de plus de 41 ans (Poynard et al., 2010).

## 2- Principales étiologies de la fibrose hépatique

Différentes pathologies sont à l'origine du développement d'une fibrose hépatique. Dans les pays industrialisés, les causes les plus communes sont l'abus d'alcool, l'hépatite B et C, les syndromes métaboliques dus à l'obésité, l'insulino-résistance et au diabète, et l'hépatite autoimmune.

### 2.1- La maladie alcoolique du foie

En Europe, la consommation chronique d'alcool est la cause principale de cirrhose, l'Europe étant elle-même la première région consommatrice du monde selon un rapport de l'organisation mondiale de la santé de 2013 (Status Report on Alcohol and Health in 35 European Countries, 2013). Cette consommation a diminué dans les années 1990, mais a par la suite remonté pour se stabiliser à un haut niveau, supérieur à 10 litres d'alcool pur par an en moyenne, même si de fortes variations sont enregistrées entre les différents pays. L'incidence de la cirrhose est 9 fois supérieure chez les patients qui présentent une hépatite alcoolique en comparaison de patients souffrant de stéatopathies. Toutefois, l'hépatite alcoolique ne se développe que chez une fraction de forts consommateurs. En prenant en compte le fait que 30 à 35% des forts consommateurs développent une forme avancée de maladie alcoolique du foie telle une fibrose avancée ou une cirrhose, la prévalence présumée et confirmée de la fibrose dans la maladie alcoolique du foie est établit à 7 et 8% respectivement (Gao and Bataller, 2011; Poynard et al., 2010). Le traitement de la maladie alcoolique du foie se focalise sur les effets comportementaux et psychologiques de la consommation d'alcool.

### 2.2- L'hépatite virale B

L'hépatite chronique virale B est la seconde cause de cirrhose mais aussi de cancer du foie. Les premiers facteurs de risque de la transmission du virus de l'hépatite B (VHB) sont le contact sexuel, une exposition percutanée à des fluides corporels infectieux, ou l'exposition périnatale à une mère infectée (Davis et al., 1989). Le risque que l'infection au VHB devienne



chronique est fonction de l'âge de la contamination. Il est de 90% lorsqu'elle est survenue chez le nourrisson, 30% chez les enfants âgés de moins de 5 ans, 1-6% chez l'adulte et 60% chez le sujet âgé (Hyams, 1995). Entre 0,5 et 0,7% de la population européenne est affectée par l'hépatite chronique virale B, avec les plus fortes prévalences enregistrées en Roumanie (5,6%) et en Grèce (3,4%). La disponibilité d'un vaccin a permis de réduire la prévalence de cette infection, bien qu'elle soit encore responsable de 30% des cas de cirrhose et de 15% des cancers primaires hépatiques.

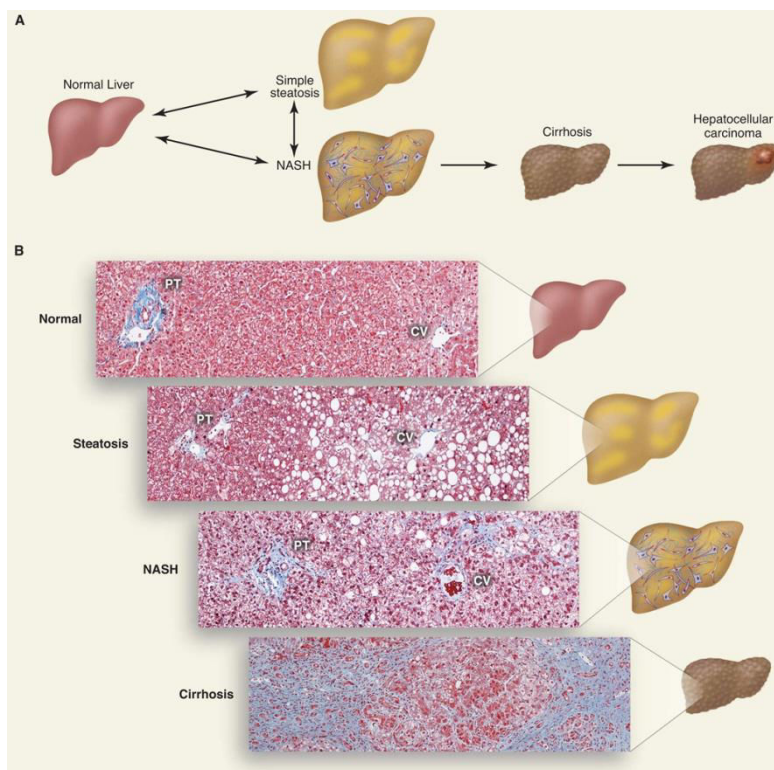
### 2.3- L'hépatite virale C

L'hépatite chronique virale C est un facteur de risque important pour l'hépatocarcinome, qui se développe plusieurs dizaines d'années après l'infection. La transmission du virus se fait par exposition percutanée avec du sang contaminé, par exemple lors de la prise de drogues avec des seringues contaminées, de transfusion (Alter, 1997) ou d'autres procédures médicales (Schvarcz et al., 1997). Le taux de prévalence de l'infection au virus de l'hépatite C (VHC) ces dernières décennies dans la population européenne était compris entre 0,12 et 3,23%, les taux les plus élevés ayant été mesurés en Italie (Fabris et al., 2008) et en Roumanie (Gheorghe et al., 2010). Des études sur l'histoire naturelle de la maladie montrent que plus de 85% des patients infectés développent une infection chronique, et 10 à 20% évoluent vers une cirrhose (Alter, 1997). Cependant, les taux de progression de la fibrose sont extrêmement variables et peuvent être influencés par l'hôte, des facteurs viraux ou environnementaux (Datz et al., 1999; Yi et al., 2004). Lorsque l'infection se prolonge sur une longue période, au-delà de 30 ans, le taux de cirrhose est d'environ 41%, ce qui est 3 fois plus élevé que le taux prédit chez des patients ayant une hépatite depuis 20 ans (Thein et al., 2008). Une série de biopsies réalisées chez des patients atteints du VHC ont montré des taux de progression de fibrose chaque année entre 0,1 et 0,2 degré (Poynard et al., 2000b, 2003). Les risques de complications chez les patients infectés par le VHC sont de plus très importants. Enfin il faut noter en Europe que 90% des personnes infectées par une hépatite virale sont asymptomatiques.

### 2.4- Les stéatopathies non alcooliques

Les stéatopathies métaboliques sont caractérisées par une surcharge graisseuse au niveau du foie dont le spectre va de la stéatose à la stéatohépatite pour conduire à une cirrhose voire au développement d'un carcinome hépatocellulaire. Elles sont également désignées par le terme de «foie gras non alcoolique» (*non alcoholic fatty liver disease*, NAFLD), soulignant ainsi les similitudes histologiques que partage cette pathologie avec les maladies alcooliques du foie.

Ces pathologies deviennent très préoccupantes en Europe et sont notamment liées à l'augmentation de l'incidence de l'obésité. L'accumulation de lipides dans le foie entraîne donc des pathologies hépatiques chroniques. Parmi celles-ci, la stéatohépatite non-alcoolique (*non alcoholic steatohepatitis*, NASH), est caractérisée par une stéatose associée à une inflammation. La NASH peut présenter différents degrés de fibrose allant de son absence (stade F0) à la cirrhose (stade F4). Les données disponibles suggèrent un taux de prévalence de la NAFLD entre 2 et 44% dans la population générale d'Europe (en incluant les enfants obèses) et 42,6 à 69,5% des personnes ayant un diabète de type 2. De plus la NAFLD augmente le risque de cirrhose et de cancer hépatique. La NASH progresse en cirrhose chez environ 10 à 15% des patients qui en souffrent (Ekstedt et al., 2006) (**Figure 5**).



**Figure 5 - Progression pathologique de la NAFLD : de la stéatose simple au carcinome hépatocellulaire** (Cohen et al., 2011).

### 3- Caractéristiques de la fibrose hépatique

La progression et la résolution de la fibrose hépatique est un processus complexe impliquant à la fois des cellules parenchymateuses et non-parenchymateuses, ainsi que des cellules immunitaires infiltrantes. La mort des hépatocytes par des mécanismes d'apoptose, de nécrose ou de nécroptose en est une étape clé. Cette mort cellulaire permet l'activation de voies inflammatoires et pro-fibrogéniques dans les cellules non-parenchymateuses et les cellules

immunitaires infiltrantes, ce qui déclenche la progression de la fibrose mais peut également contribuer à sa résolution.

La réponse fibrotique est caractérisée par une augmentation de la production de composants de la MEC par les myofibroblastes du foie et à des modifications de sa composition. Les conséquences de ces désordres sont mécaniques et physiques, mais également d'ordre fonctionnel puisque des fonctions cellulaires comme la croissance, la migration, et l'expression de gènes sont, en partie, liées aux interactions directes des cellules avec les composants de la MEC. Par ailleurs, la MEC fonctionne également comme un réservoir de médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques.

La composition de la matrice du foie normale est essentiellement du collagène de type IV et VI, des glycoprotéines et des protéoglycanes, qui vont être remplacé dans un contexte de maladie chronique par du collagène de type I et III et de la fibronectine (Brown et al., 2006; Hahn et al., 1980; Rojkind et al., 1979).

#### 4- Modèles d'étude

##### 4.1- Modèles *in vivo* de fibrose hépatique

##### 4.1.1- Modèles d'exposition à des xénobiotiques

##### ➤ L'éthanol

La consommation d'alcool est la principale cause de pathologies chroniques du foie. L'*alcoholic liver disease* (ALD) commence généralement par une stéatose qui peut progresser en fibrose puis en cirrhose. Dans le foie, l'éthanol est métabolisé par l'alcool déshydrogénase et les CYP. Ce processus est associé à plusieurs événements délétères, tels la production d'ERO, une déplétion en glutathion, une peroxydation lipidique et une augmentation de la synthèse de composants de la MEC (Beier and McClain, 2010; Lieber, 1997). Ensemble, ces mécanismes induisent l'apoptose des hépatocytes, une inflammation et l'activation des CEF. Bien que les rongeurs aient une aversion naturelle pour l'alcool, à l'exception des souris de la lignée HAP-2 (Lopez et al., 2011) et de la lignée C57BL/6 (Metten and Crabbe, 2005), ils restent le modèle d'étude de l'ALD le plus communément utilisé. Les souris sont plus susceptibles de développer une ALD avec l'alcool que les rats (Shinohara et al., 2010), avec une meilleure efficacité chez les femelles (Melón et al., 2013). Le régime à base de liquide de Lieber-DeCarli (DeCarli and Lieber, 1967; Leo and Lieber, 1983), l'administration d'alcool

dans l'eau de boisson (Best and Hartroft, 1949; Keegan et al., 1995) et le modèle de gavage intragastrique de Tsukamoto-French (French, 2001; Tsukamoto et al., 1984) ne parviennent cependant pas à reproduire toutes les étapes du développement de la fibrose hépatique observée chez l'Homme. De nouvelles techniques expérimentales ont été en conséquence développées, impliquant la combinaison de l'éthanol avec un second stimulus, incluant des régimes spécifiques, des agents pharmacologiques, des inducteurs des CYP, des hormones, des ligands des *Toll-like receptors* (TLR), de la manipulation génétique ou des infections virales (Brandon-Warner et al., 2012; Enomoto et al., 1998). Cependant, ces modèles combinés sont conduits par une multitude de mécanismes qui peuvent compliquer l'interprétation des résultats.

➤ Le tétrachlorure de carbone

Le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) est l'hépatotoxine la plus couramment utilisée dans l'étude de la fibrose et de la cirrhose chez les rongeurs. Par de nombreux aspects, ce modèle reproduit la maladie chronique du foie humaine liée à des dommages toxiques. La transformation hépatique du CCl<sub>4</sub> repose sur l'activité du CYP2E1 et permet la production de radicaux trichlorométhyle. Ceux-ci sont impliqués dans des processus de réactions aux radicaux libres et de peroxydations lipidiques (Basu, 2003; Weber et al., 2003) qui contribuent à la phase aiguë caractérisée par la nécrose des hépatocytes centro-lobulaires, l'activation des cellules de Kupffer et l'induction d'une réponse inflammatoire (Heindryckx et al., 2009). Cette phase est associée à une production de cytokines, qui promeut l'activation des CEF d'où une fibrose hépatique (Iwaisako et al., 2014). Le CCl<sub>4</sub> peut être administré aussi bien chez le rat que chez la souris. Cependant, la souris est souvent privilégiée car elle possède un métabolisme du CCl<sub>4</sub> plus rapide que son congénère (Thrall et al., 2000). La susceptibilité des souris à développer une fibrose en réponse au CCl<sub>4</sub> est dépendante de la souche utilisée. Ainsi, les souris BALB/c manifestent une fibrose hépatique plus importante vis-à-vis du CCl<sub>4</sub> en comparaison aux souris C57BL/6 et DBA/2 (Shi et al., 1997; Walkin et al., 2013). La stratégie la plus communément utilisée consiste à injecter du CCl<sub>4</sub> par voie intrapéritonéale 2 à 3 fois par semaine pendant 4 à 6 semaines avec des doses allant de 300 à 1000 µL/kg (Constandinou et al., 2005). Récemment, des modèles de souris C57BL/6 ont été standardisés sur la base d'injections intrapéritonéales de CCl<sub>4</sub> entre 500 et 700 µL/kg de masse corporelle 2 fois par semaine pendant 6 semaines ou bien 3 fois par semaine pendant 4 semaines. De façon alternative, le CCl<sub>4</sub> peut être administré par voie orale, par voie sous-cutanée ou par inhalations 2 fois par semaine pendant 10 semaines, entre 4 et 8 semaines ou entre 2 et 6

semaines respectivement. Mais l'administration orale du  $\text{CCl}_4$  est controversée. En effet, certaines études affirment que cette voie d'administration permet une plus grande reproductibilité dans les résultats avec des taux de survie meilleurs (Jang et al., 2008), tandis que d'autres rapportent des taux de mortalité trop importants (Scholten et al., 2015). Les injections sous-cutanées permettent d'enregistrer une diminution de la mortalité chez la souris. Cependant ces animaux développent des granulomes dans la zone de l'injection (Domenicali et al., 2009; Geerts et al., 2008). Enfin, bien que l'administration par inhalation présente de nombreux désavantages, incluant la nécessité de disposer de tous les équipements de protection nécessaires et des connaissances techniques (Tsujiura et al., 2008), il semble représenter le meilleur modèle pour étudier les complications observées lors d'une cirrhose, à savoir la survenue d'une hypertension portale et la formation d'ascites (Domenicali et al., 2009; Liedtke et al., 2013).

#### ➤ Le Thioacetamide

A l'instar du  $\text{CCl}_4$ , le thioacetamide (TAA) requiert une activation métabolique pour devenir toxique. Ce processus de bioactivation, catalysé par le CYP2E1, conduit à la formation de TAA sulfoxyde puis de TAA sulfure dioxyde, responsable de la toxicité générale. Les mécanismes à l'origine de l'induction de la fibrose hépatique par le dioxyde de TAA sulfure ne sont pas entièrement élucidés, mais ils pourraient impliquer une diminution de la régulation des enzymes impliquées dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras, la cassure de chaînes ramifiées d'acides aminés et de méthionine, et l'augmentation de la régulation de protéines liées à la peroxydation des lipides et du stress oxydant (Low et al., 2004). Dans tous les cas, de graves dommages oxydatifs apparaissent et sont associés à l'activation des CEF. Les rats sont l'espèce privilégiée pour étudier la fibrose hépatique induite par le TAA, mais cette molécule est également fréquemment utilisée chez la souris. Le TAA est injecté en général par voie intrapéritonéale à des doses comprises entre 100 et 200 mg/kg, 3 fois par semaine pendant 6 à 8 semaines. Les animaux présentent alors une augmentation de la masse du foie, avec des nécroses centro-lobulaires et une légère infiltration de cellules inflammatoires accompagnée par des niveaux sériques élevés d'alanine aminotransférase et d'aspartate aminotransférase (Chen et al., 2012a). Récemment, ce modèle a fait l'objet d'une standardisation. Il est recommandé de l'administrer à des doses de 150 mg/kg, 3 fois par semaine pendant une période comprise entre 8 et 12 semaines (Wallace et al., 2015). Lorsqu'il est administré par voie orale, de plus fortes doses de 200 à 300 mg/kg sont requises ainsi qu'une plus longue période de traitement soit 16 semaines (Salguero Palacios et al.,

2008). Enfin, lorsque le TAA est administré par voie orale dans l'eau de boisson à 300 mg/L, une fibrose hépatique est enregistrée chez les souris C57BL/6 mais après une période de 2 à 4 mois de traitement (Wallace et al., 2015).

➤ Le dimethylnitrosamine et le diethylnitrosamine

Le dimethylnitrosamide (DMN) et le diethylnitrosamine (DEN) sont des composés carcinogènes qui sont fréquemment utilisés chez l'animal pour induire une fibrose hépatique. Leur biotransformation entraîne la production d'ERO en grande quantité. Celles-ci réagissent alors avec les acides nucléiques (Verna et al., 1996), les protéines (Aparicio-Bautista et al., 2013) et les lipides (Sánchez-Pérez et al., 2005), en entraînant des défauts de fonctionnement cellulaire et le développement d'une nécrose centro-lobulaire (Oh et al., 2009). La susceptibilité des souris à développer un carcinome hépatocellulaire après exposition au DEN est déterminée, du moins en partie, par la souche. A cet égard, les souris C3H et B6C3F1 sont plus susceptibles de développer des tumeurs en comparaison des souris C57BL/6 (Buchmann et al., 1991). Chez le rat, la souche R16 est la plus susceptible aux produits chimiques carcinogènes (Melhem et al., 1989).

#### 4.1.2- Modèles basés sur des régimes alimentaires spéciaux

De nombreux modèles expérimentaux à base de régimes spécifiques ont été étudiés pour tenter de reproduire la progression d'une NAFLD vers une NASH (Anstee and Goldin, 2006). Ce sont les souris C57BL/6 qui sont le plus susceptibles de développer une fibrose suite à un régime alimentaire comparé à la souche BALB/c (Farrell et al., 2014; Walkin et al., 2013). Toutefois, ces modèles échouent à reproduire les principales caractéristiques de la pathologie humaine, restreignant par conséquent l'extrapolation des résultats obtenus (Anstee and Goldin, 2006).

➤ Régime déficient en Méthionine et Choline

Les souris soumises à un régime déficient en Méthionine et Choline (MCD) constituent un modèle fréquent de NASH. Cependant, ce modèle n'implique pas deux des caractéristiques majeures de la pathologie humaine, à savoir l'obésité et une insulino-résistance périphérique prononcée (Rinella and Green, 2004). Par contre, le régime MCD reproduit le stress hépatique induit par le flux d'acides gras en provenance du tissu adipeux jusqu'au foie, ainsi qu'une augmentation de la production de triglycérides, conduisant à une stéatose et une lipotoxicité (Jha et al., 2014). Les cellules de Kupffer semblent jouer un rôle important dans l'initiation et

la progression de la stéatose induite par le régime MCD, puisque ce sont les premières cellules à réagir aux dommages des hépatocytes. Les cellules de Kupffer activées sont à l'origine d'une augmentation de la production de *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$  et du recrutement de monocytes (Tosello-Tramont et al., 2012) et semblent contrôler le dépôt de fibres de collagène en sécrétant de hauts niveaux de métalloprotéase (MMP)-13 (Itagaki et al., 2013). De plus, l'infiltration de ces cellules peut également promouvoir l'augmentation de la régulation de voies pro-inflammatoires (Ramadori et al., 2015). Dans ce modèle, les cellules CEF sont également activées, ce qui permet à la maladie d'évoluer vers un profil fibrotique. Les souris sous régime MCD développent une stéatohépatite après 8 semaines, et le niveau le plus fibrotique, en particulier lorsqu'il affecte les zones portales, est observé après 16 semaines (Itagaki et al., 2013).

➤ Régime riche en graisse

Les régimes riches en graisse, au contraire du régime MCD, entraînent une augmentation de poids chez les animaux ainsi qu'une insulino-résistance périphérique. Mais bien que ce modèle conduise à des caractéristiques phénotypiques relativement similaires à celles de la NASH, il requière 50 semaines avant l'apparition des premiers signes de stéatohépatite accompagnés d'un niveau assez faible de fibrose (Ito et al., 2007). Les souris C57BL/6 mâles sont les animaux qui répondent le mieux à un régime riche en graisse (Ganz et al., 2014). Les rats n'y sont pas sensibles mais un modèle alternatif à base de régime riche en cholestérol a été développé chez cette espèce. Ce régime particulier permet l'apparition d'une NASH fibrotique en 9 semaines avec potentiellement l'apparition d'une cirrhose (Ichimura et al., 2015). Mais dans ce modèle, les deux caractéristiques de la pathologie humaine à savoir l'obésité et l'insulino-résistance ne sont pas observées.

➤ Régime *Choline Deficient L-Amino Acid defined diet* (CDAA)

Ce régime entraîne un phénotype similaire à celui du régime MCD, tout en induisant une augmentation de poids et une insulino-résistance périphérique (De Minicis et al., 2014; Denda et al., 2002). De plus dans ce modèle, les rats mais aussi les souris C57BL/6J développent fréquemment des tumeurs du foie associées à la fibrose (Denda et al., 2002; Nakae et al., 1992), ce qui permet l'étude de la progression de la NAFLD en NASH et par la suite en CHC. Un temps de 22 semaines est nécessaire pour entraîner le développement d'une fibrose et de 84 semaines pour la survenue d'un CHC (Denda et al., 2002).

#### 4.1.3- Modèles de cirrhose biliaire secondaire

Le principe de ces modèles est une interruption du flux biliaire en général par ligature-section du canal cholédoque pour conduire à des lésions cholestatiques et une fibrose biliaire périportale (Rodríguez-Garay et al., 1996). Ce modèle a été établi à l'origine chez le rat et fut plus tard appliqué à d'autres espèces animales (Miyoshi et al., 1999; Rodríguez-Garay et al., 1996). Ce modèle se caractérise par une augmentation de la pression biliaire, une faible inflammation impliquant la sécrétion de cytokines par les cellules épithéliales biliaires, engendrant ainsi une cholestase. On note également une prolifération des cellules épithéliales biliaires, une augmentation de l'expression des marqueurs fibrogéniques, incluant le tissu inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1, l'*α-smooth muscle actin* (SMA), le collagène de type I et le TGF-β1, ainsi que l'accumulation de cellules T et B dans les espaces porte (Georgiev et al., 2008), générant des ERO et des dommages hépatiques. Une étude récente affirme que, malgré le rôle clé des cellules CEF dans la fibrogénèse, la fibrose portale pourrait être conduite par un autre type cellulaire, les fibroblastes portaux activés (Iwaisako et al., 2014). Ces derniers sont une source de myofibroblastes dans ce modèle et pourraient activer les cellules CEF *via* l'interleukine (IL)-13 (Iwaisako et al., 2014). Ces événements semblent pouvoir être réversibles après anastomose bilio-digestive (Abdel-Aziz et al., 1990; Aronson et al., 1993). Le taux de mortalité est compris, en fonction des espèces, entre 25 et 40 % à 4 semaines. Les pertes surviennent principalement durant les premières semaines (cholangite, péritonite biliaire, hémorragie) et les animaux survivent rarement plus de 8 à 10 semaines. Ces modèles peuvent être particulièrement utile pour des études à court-terme de la fibrose hépatique associée avec des dommages cholestatiques (Chang et al., 2005; Iwaisako et al., 2014; Park et al., 2014).

#### 4.1.4- Modèles animaux génétiquement modifié

Les modèles faisant appel à des animaux génétiquement modifiés ont permis au cours des dernières décennies d'approfondir les connaissances sur le rôle d'un grand nombre de protéines spécifiques et de voies de signalisation impliquées dans la fibrose hépatique. Ils ont été développés également pour permettre l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques (Hayashi and Sakai, 2011). Toutefois, il est très difficile d'observer une fibrose hépatique sur la seule base des manipulations génétiques effectuées. Les protocoles expérimentaux associent donc couramment un ou plusieurs autres stimulus (Larter and Yeh, 2008).



- Modèles de résistance pléiotropique ou « multidrogue » associée à l'absence de la protéine MDR2

Mdr2 est l'homologue du gène de l'*adenosine triphosphate-binding cassette subfamily B member 4* humain, qui code pour une P-glycoprotéine impliquée dans l'excrétion des phospholipides biliaires (Morita et al., 2013). L'absence de cette P-glycoprotéine bloque la sécrétion des phospholipides dans la bile. Les souris déficientes Mdr2 développent un phénotype qui s'apparente à la cholangite sclérosante primitive humaine, dont les symptômes sont une nécrose hépatocytaire, une inflammation portale, la destruction des canalicules et des petits tractus ductaux de bile et une fibrose ductale en « pelure d'oignon » (Fickert et al., 2004; Morita and Terada, 2014). Les souris déficientes Mdr2 développent une fibrose biliaire à l'âge de 4 à 8 semaines. Dès 4 semaines, une augmentation de l'expression du TGF- $\beta$  ainsi que des marqueurs d'activation des CEF, dont l' $\alpha$ -SMA, la MMP-2 et le *platelet derived growth factor* (PDGF) *receptor*  $\beta$ , ont été observés (Popov et al., 2005). Ces événements sont accompagnés par une prolifération des fibroblastes périductaux et d'une fibrose, d'une infiltration granulocytaire et d'une nécrose partielle du canal biliaire (Fickert et al., 2002). Un dépôt de collagène est observé dès la 8<sup>ème</sup> semaine, amenant à la formation d'une fibrose cicatricielle avec l'obstruction du canal biliaire. Les souris déficientes Mdr2 âgées de 4 à 6 mois peuvent développer un CHC (Mauad et al., 1994).

- Souris mutantes Alms1 « Fat aussie »

Les souris « Fat aussie » (Alms1 foz/foz) présentent une délétion spontanée de 11 paires de bases (foz) sur le gène Alms1, gène impliqué dans la maladie d'Alström chez l'Homme. Lorsqu'ils sont nourris avec un régime riche en graisse, ces animaux présentent une obésité hyperphagique, une insulino-résistance, une hépatomégalie, un diabète, une hypoadiponectinémie, de forts niveaux d'alanine aminotransférase, une inflammation, de nombreux hépatocytes « ballonnés » et une fibrose péricellulaire et péricentrale (Arsov et al., 2006). Après 24 semaines d'un régime riche en lipides, les souris « Fat aussie » atteignent une limite dans la capacité d'expansion de leur tissu adipeux, avec pour conséquence un afflux lipidique au foie et une diminution des niveaux sériques d'adiponectines. Ces animaux présentent alors une inflammation du tissu adipeux et développent des dommages hépatocytaires, une hépatomégalie et une inflammation du foie (Larter et al., 2009). Il a été montré par ailleurs que la présence de cholestérol dans le régime peut permettre de reproduire la transition de la NAFLD vers la NASH (Van Rooyen et al., 2011). Une autre étude a

démonstré que l'obésité et l'inflammation adipeuse perduraient dans le temps même après avoir réintroduit un régime alimentaire équilibré (Larter et al., 2013). Ce modèle repose donc sur les interactions entre un régime alimentaire riche en lipides et le génotype particulier de ces souris.

#### 4.1.5- Modèles infectieux

Les modèles infectieux ont permis d'élucider certains mécanismes du système immunitaire spécifiques dans le foie (Starkel and Leclercq, 2011). L'hépatite virale B induit une fibrose hépatique chez l'Homme mais pas chez le rongeur. Par conséquent, il a fallu travailler avec des souris génétiquement modifiées pour exprimer la région codante de l'enveloppe du VHB dans les hépatocytes (Chisari et al., 1986). Ces souris ne développent alors pas spontanément une hépatite du foie car leur système immunitaire est tolérant vis-à-vis de ces protéines virales. Pour induire l'hépatite B, il est nécessaire de pratiquer une thymectomie et une irradiation puis de leur transférer des cellules de la moelle osseuse prélevée chez des souris non transgéniques ainsi que des cellules de la rate de souris également non transgéniques et préalablement immunisées par un antigène du VHB (Chisari et al., 1986; Nakamoto et al., 2004). Ce modèle a principalement permis de démontrer l'importance des réactions immunitaires dans la progression de la pathologie vers le carcinome hépatocellulaire (Sitia et al., 2012). Une méthode alternative consiste à travailler avec des souris immunodéficientes transfectées avec un plasmide du VHB (McCaffrey et al., 2003).

L'infection à *Schistosoma mansoni* chez la souris est un bon modèle du fait des ressemblances observées avec l'infection chez l'Homme mais aussi de sa grande reproductibilité (Cheever et al., 2002). Cependant, des variations de niveaux de fibrose hépatique sont observés en fonction de la souche de souris étudiée. Ce sont les souris C3H/HeN qui y sont le plus sensibles et qui développent de haut niveau de fibrose (Cheever et al., 1987; Chiaramonte et al., 2001).

De façon alternative, les animaux peuvent être infectés par l'administration de cercaire (Cheever et al., 2002; Chiaramonte et al., 2001). Les cercaires, au stade adulte, peuvent produire plus de 100 œufs par jour, qui vont se retrouver piégés dans le foie. On constate alors la formation de granulomes associés à une fibrose hépatique (Cheever et al., 2002; Chiaramonte et al., 2001). Le développement de ces derniers est régulé par les cytokines des lymphocytes T *helper* 2 (Wynn and Cheever, 1995), et tout particulièrement l'IL-13 dans un

modèle à *Schistosoma mansoni* (Chiaramonte et al., 2001) et l'IL-17A dans une infection à *Schistosoma japonicum* (Zhang et al., 2015), ce qui souligne le rôle des cytokines dans le développement des maladies chroniques du foie. De plus, la présence de CEF activés au bord des granulomes formés par les œufs de *Schistosoma japonicum* a été observé chez l'humain et le rongeur (Bartley et al., 2006). Pris ensemble, ces travaux indiquent que les cytokines contribuent dans ces modèles infectieux à l'activation des CEF et donc la fibrose hépatique.

#### 4.2- Modèles *in vitro* de fibrose hépatique

##### 4.2.1- Les cellules étoilées du foie en culture primaire

Les CEF en culture primaire, directement dérivés de tissus sains hépatiques, permettent de disposer d'un bon reflet de la situation hépatique *in vivo*. Cependant, ces cultures posent également de nombreux problèmes, qui proviennent des procédures d'isolement et de culture. La méthodologie classique d'isolement des CEF est basée sur une séparation dans un gradient de densité en utilisant du Percoll, du Nycodenz, du Stractan ou du metrizamide. La densité des CEF est faible en raison de leur grande quantité de contenu lipidique. Cela facilite la séparation des autres types cellulaires du foie, laissant un surnageant contenant plus de 75% de CEF (Weiskirchen and Gressner, 2005). Cette méthode de séparation par densité ne peut cependant pas être appliquée aux jeunes animaux ou aux animaux souffrants d'une maladie du foie en raison d'un faible contenu lipidique. Cet obstacle peut être surmonté, du moins en partie, par cytométrie de flux en réalisant un tri par fluorescence à l'aide d'un laser ultraviolet capable d'exciter la vitamine A et donc d'isoler les CEF avec une grande sélectivité (Geerts et al., 1998; Tacke and Weiskirchen, 2012). Cependant, cette procédure, qui prend beaucoup de temps, ne permet d'isoler que de petites quantités de CEF. Une méthode alternative est basée sur des injections en intraveineuses de dichlorométhylène disphosphate encapsulé dans des liposomes afin d'éliminer les cellules de Kupffer chez la souris avant d'isoler les CEF (Chang et al., 2014). Cela permet d'obtenir un meilleur rendement en CEF. Lorsque les CEF sont ensemencées dans des puits de culture, elles s'activent spontanément et deviennent des myofibroblastes tel que cela se passe lors de la fibrose hépatique. Cette activation spontanée *in vitro* déclenche un profil d'expression génique différent du processus *in vivo*, ce qui peut ne pas refléter totalement les mécanismes pathophysiologiques se manifestant lors de la fibrogénèse hépatique (De Minicis et al., 2007). En conséquence, plusieurs stratégies ont été développées pour contrecarrer l'activation spontanée des CEF, telles la culture des cellules sur du Matrigel<sup>®</sup>, qui imite la MEC du foie (Gaça et al., 2003), ou le maintien des cellules en

suspension (Friedman et al., 1994). Comme les autres cellules primaires, la durée de vie des CEF est limitée en culture ce qui gêne leur utilisation. Encore plus, malgré l'amélioration des techniques d'isolation et de purification des CEF en culture primaire, ces cellules peuvent être contaminées avec les autres types cellulaires. Finalement, l'établissement de culture de CEF humain est limité par le manque de tissus biologiques humains à des fins scientifiques (Herrmann et al., 2007).

#### 4.2.2- Les lignées cellulaires

Les lignées cellulaires représentent une alternative à la culture primaire de cellules et offrent plusieurs avantages comme une facilité d'utilisation, un apport illimité et une grande reproductibilité inter-laboratoire des résultats (Herrmann et al., 2007). Cependant, ces cellules ont souvent perdu certaines caractéristiques morphologiques et fonctionnelles, questionnant ainsi leur pertinence. Toutefois, une grande variété de lignées cellulaires de CEF de souris, rat mais aussi humaines sont utilisées dans la recherche fondamentale sur la fibrose hépatique.

##### ➤ Lignées murines

L'une des premières lignées décrites est la lignée murine GRX obtenue à partir d'un granulome fibrotique hépatique chez une souris C3H/HeN infectée à *Shistosoma mansoni* (Borojevic et al., 1985). En culture, les cellules GRX présentent un phénotype myofibroblastique et prolifèrent sans confluence du fait d'une faible inhibition de contact. Cependant, lorsque ces cellules sont transférées dans un milieu de culture contenant de l'insuline et de l'indométhacine ou du rétinol, elles adoptent un phénotype de stockage de lipides et s'organisent en une monocouche. Les deux phénotypes de ces cellules sont capables d'exprimer du collagène de type I, III, et IV, de la fibronectine, la laminine, la vimentine, la desmine, la *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) et l' $\alpha$ -SMA (Pinheiro-Margis et al., 1992), cependant la production de ces différents types de collagène, de desmine et de GFAP dans le phénotype de stockage de lipides est faible (Guma FCR et al., 2001; Pinheiro-Margis et al., 1992). Ce phénotype est capable de prendre en charge et de métaboliser le rétinol tout comme les CEF (Guma FCR et al., 2001; Pinheiro-Margis et al., 1992). Ainsi la lignée cellulaire GRX est un outil intéressant pour l'étude des changements lipidiques tels qu'ils ont lieu lors de la fibrose hépatique (Fortuna et al., 2001; Guimarães et al., 2007) et l'étude de l'action de molécules dans la réversion du phénotype activé des CEF (de Mesquita et al., 2013; Stefano et al., 2011).

Les cellules de la lignée A640-IS sont des CEF isolés de souris mâles ICR « *imprinting control region* » transfectées avec l'antigène T du virus simien 40 (TSV40). Cette lignée est sensible à la température, les cellules acquièrent un phénotype myofibroblastique et prolifératif à 33°C et une morphologie plus proche des CEF à 39°C. Les deux phénotypes de ces cellules sont capables d'exprimer du collagène de type I, III, et IV, de la fibronectine, la laminine, la vimentine, la desmine, et l' $\alpha$ -SMA. La desmine est fortement exprimée à 39°C tandis que l' $\alpha$ -SMA est présente dans des cultures à faibles densités pour les deux températures (Kitamura et al., 1997). Une autre lignée avec une origine similaire est la lignée SV68c-IS. Ces cellules affichent une forme myofibroblastique, expriment le collagène de type I, III, la desmine, l' $\alpha$ -SMA et la GFAP (Horie et al., 2000). Les cellules A640-IS et les cellules SV68c-IS présentent des caractéristiques proches de celles des CEF activés chez les rongeurs (Horie et al., 2000; Kitamura et al., 1997). Cependant, leur utilisation est restreinte compte tenu de leurs comportements assez éloignés des observations *in vivo*.

La lignée cellulaire M1-4HSC provient de souris mâles « null p19<sup>ARF</sup> ». Ces cellules développent deux phénotypes différents sous l'influence du TNF $\beta$ 1. En absence de TNF $\beta$ 1, les cellules M1-4HSC sont assez semblables à des CEF quiescentes capables d'exprimer du procollagène I, de la vimentine, de la desmine, de l' $\alpha$ -SMA et du GFAP. En présence de TNF $\beta$ 1, les cellules M1-4 adoptent un phénotype plus myofibroblastique et produisent du procollagène I, de la vimentine, de l' $\alpha$ -SMA et de la GFAP (Proell et al., 2005). Cependant, ces cellules ne manifestent pas d'autres marqueurs de l'activation des CEF (Proell et al., 2005).

Les lignées de cellules immortalisées JS1, JS2 et JS3 ont été obtenues à partir de CEF isolées de souris C57BL/6 *wild-type*, déficientes en TLR4 et déficientes en *myeloid differentiation primary response gene 88* (Myd88) respectivement. Par la suite, ces cellules ont été transfectées avec le promoteur du cytomégalo virus TSV40. Elles ont été créées afin d'explorer les différentes voies de signalisation impliquées dans l'activation des CEF en présence de lipopolysaccharide (LPS) (Guo et al., 2009a). Leurs caractéristiques principales reposent sur leur capacité à être transfectée. Malgré que trois lignées cellulaires aient été créées, c'est la lignée JS1 qui a été la plus utilisée. Grâce à son fort potentiel de transfection, la lignée JS1 est considérée comme un outil intéressant pour tester l'efficacité de l'expression de différents vecteurs (Ghiassi-Nejad et al., 2013), mais également pour l'expression ou la répression de

gènes spécifiques par sélectivité (Guo et al., 2009a; Lim et al., 2011). En conséquence cette lignée a permis l'élucidation de mécanismes apoptotiques dans les CEF (Lim et al., 2011).

Plus récemment, une nouvelle lignée cellulaire murine, appelée « *Col-green fluorescence protein (GFP)* », a été décrite. Les cellules Col-GFP sont des CEF isolés de souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle d'un promoteur du gène du collagène de type I et traitées avec du CCl<sub>4</sub> pendant 8 semaines (Meurer et al., 2013). Afin d'immortaliser ces cellules, un vecteur de lentivirus contenant un TSV40 et un gène de résistance à la hygromycine ont été utilisés. Ces cellules sont caractérisées par l'expression du collagène de type I et IV, de la fibronectine, de la desmine, de l' $\alpha$ -SMA, de la GFAP, du *connective tissue growth factor* (CTGF) et l'inhibiteur de différenciation-2. Ces cellules Col-GFP sont considérées comme étant prometteuses pour l'évaluation des effets de molécules potentiellement anti-fibrotiques (Meurer et al., 2013).

#### ➤ Lignées de rat

Les cellules de stockage de lipides normales (NFSC) et les cellules de stockage de lipides cirrhotiques (CFSC) sont issues de l'immortalisation spontanée d'un foie normal et cirrhotique de rats mâles Wistar. Ces deux types cellulaires présentent un phénotype fusiforme et expriment le collagène de type I, III, la fibronectine, la laminine, la vimentine, la desmine et le TGF- $\beta$ 1 (Greenwel et al., 1991). Contrairement aux CFSC, les cellules NFSC produisent de l'IL-6. Ces deux lignées présentent ainsi un intérêt pour l'étude de la production de collagène. La sélection de quatre clones pour la lignée CFSC, nommés CFSC-8B, CFSC-2G, CFSC-3H et CFSC-5H qui présentent une expression différentielle pour les procollagènes de type I, III et IV, de sous-unité  $\alpha$ 1, de l'IL-6, du TGF- $\beta$  et de la connexine 43 (Greenwel et al., 1993), permet d'établir l'hétérogénéité de la population cellulaire et de comprendre son impact sur la composition de la matrice extracellulaire. Il est vraisemblable que ce phénomène se produise *in vivo* (Greenwel et al., 1993).

La lignée cellulaire HSC-T6 a été développée par la transfection de cellules CEF de rats mâles Sprague-Dawley avec un vecteur de type TSV40 (Vogel et al., 2000). Ces cellules présentent un phénotype myofibroblastique et sont capables de former des gouttelettes lipidiques et d'accumuler dans leur cytoplasme des esters de retinyl en présence de rétinol. L'expression des collagènes de type I, III et IV, la fibronectine, la laminine, la vimentine, la desmine, l' $\alpha$ -SMA, la GFAP, le TIMP-1, le TIMP-2 et le TGF- $\beta$ 1 par ces cellules démontre un phénotype

proche des CEF activés (Kim et al., 1998; Li et al., 2013; Vogel et al., 2000). En outre, 6 récepteurs nucléaires aux rétinoïdes, incluant le *retinoid acid receptor*  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , et le *retinoid X receptor*  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , peuvent être détectés dans les cellules HSC-T6 (Vogel et al., 2000), ce qui est un marqueur typique des CEF quiescentes. Ainsi, les cellules HSC-T6 peuvent se comporter à la fois comme des CEF quiescentes et activées. Ces cellules ont été utilisées avec succès pour déterminer les voies de signalisation impliquées dans l'expression de collagène et pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques de la fibrose hépatique (Liu and Huang, 2014).

La lignée de cellules étoilées biliaires (BSC) a été développée à partir de CEF isolées de rats présentant une fibrose biliaire du foie (Sung et al., 2004). L'un des clones de BSC générés par immortalisation spontanée est le BSC-C10 qui exprime des marqueurs d'activation des CEF, tels que le procollagène  $\alpha 1$ , la desmine, l' $\alpha$ -SMA, la GFAP, la molécule d'adhérence cellulaire neutre, la molécule d'adhérence cellulaire vasculaire, et la synaptophysine (Sung et al., 2004). La lignée BSC a été particulièrement utilisée pour étudier le rôle de voies de signalisation impliquées dans l'activation des CEF (Ramani and Tomasi, 2012; Sung et al., 2004).

Les cellules PAV-1 sont des cellules immortalisées d'apparence myofibroblastique. Les cellules PAV-1 expriment les mêmes marqueurs d'activation que les cellules HSC-T6, mais ne sont pas capables de produire du collagène III, de GFAP, de TIMP-1 et de TIMP-2 (Sauvant et al., 2002a, 2002b). De plus, les cellules PAV-1 expriment également les récepteurs  $RAR\alpha$  et  $RXR\alpha$  et sont capables de prendre en charge et de métaboliser le rétinol présent dans le milieu de culture cellulaire (Abergel et al., 2006; Sauvant et al., 2002a, 2002b). Cette lignée cellulaire a été utilisée dans la recherche sur la maladie alcoolique du foie. En présence d'éthanol, le métabolisme du rétinol dans les cellules PAV-1 est perturbé, diminuant ainsi les niveaux de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme et donc tournant la cellule vers un phénotype plus activé (Sauvant et al., 2002a, 2002b).

La lignée cellulaire immortalisée T-HSC/C16 a été développée en vue de dévoiler les mécanismes apoptotiques impliqués dans l'activation des CEF. Ces cellules expriment le collagène de type I, la desmine, l' $\alpha$ -SMA, la GFAP et le TGF- $\beta$  (Kim et al., 2003). Depuis ce temps, ces cellules ont été utilisées pour étudier l'action de médicaments anti-fibrotiques (Bai et al., 2013; Kim et al., 2003; Yin et al., 2007).

Les cellules immortalisées spontanément MFBY2 ont été isolées d'un foie cirrhotique de rat. Elles expriment des marqueurs d'activation des CEF comme l' $\alpha$ -SMA, les collagènes de type I et III, la fibronectine et le TIMP-1 (Isono et al., 2003). Lorsqu'elles sont transfectées avec un adénovirus contenant le peptide terminal du TGF- $\beta$ 1, les cellules MFBY2 présentent une forme cellulaire proche des CEF avec un arrêt de la prolifération. Après cette transfection, la production de collagènes, de fibronectine et de TIMP-1 chute drastiquement, tandis que la production de GFAP et la prise en charge et l'estérification du rétinol sont conservées (Isono et al., 2003).

La lignée cellulaire immortalisée HSC-PQ est obtenue après exposition de cultures confluentes de CEF de rats à un rayonnement ultraviolet. Le phénotype myofibroblastique ainsi que l'expression de collagènes de type I et III, de fibronectines, de laminines, de desmines et d' $\alpha$ -SMA (Pan et al., 2005) indique une similarité avec les CEF activées.

La lignée cellulaire RNPC a été immortalisée en accord avec un protocole identique à celui utilisé pour les cellules T-HSC/C16. Cependant, cette lignée cellulaire n'exprime que l' $\alpha$ -SMA et la desmine à de faibles niveaux (Takenouchi et al., 2010), limitant ainsi leur utilisation dans la recherche sur la fibrose hépatique.

Plus récemment, deux lignées cellulaires de myofibroblastes portaux de rats Sprague-Dawley nommées RGF-N2 et RGF ont été établies. Ces deux lignées expriment des marqueurs myofibroblastiques tels le collagène de type I et XV, l'élastine, la vimentine, l' $\alpha$ -SMA, le TIMP-1, la fibuline-2, la *lysyl oxidase-like 1-4* et la cytoglobine. Par contre, d'autres marqueurs de CEF, incluant la desmine et la lecithine-rétinol acyltransférase sont absents. De plus, elles expriment aussi des récepteurs membranaires des myofibroblastes comme le récepteur 1 du TGF- $\beta$ , le récepteur  $\beta$  du PDGF, le récepteur à l'*epithelial growth factor*, le récepteur de l'*insulin-like growth factor (IGF) 1*, le récepteur 1a et 1b du TNF et d'autres récepteurs comme le récepteur  $\alpha$  de l'IL-4, le récepteur  $\alpha$ 1 de l'IL-13, le Cd200 et Cd9. La différence entre ces deux lignées repose sur l'expression du récepteur 2 au VEGF qui n'est présent que dans les cellules RGF (Fausther et al., 2015).

➤ Lignées cellulaires humaines

La lignée cellulaire LI90 est la première lignée cellulaire immortalisée de CEF humain développée à partir d'un hémangioendothéliome épithélioïde. Les cellules LI90 se présentent



sous une forme polygonale et sont caractérisées par un fort taux de prolifération et peu d'inhibition de contact. Elles forment en culture des multicouches. Les cellules LI90 produisent plusieurs types de collagène (I, III, IV, V et VI), de la fibronectine, de la laminine, de la vimentine, et de l' $\alpha$ -SMA. De plus, lors de culture enrichie en vitamine A, ces cellules peuvent former des gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme (Murakami et al., 1995). Cette lignée est particulièrement intéressante pour caractériser l'effet de molécules cibles sur l'activation des CEF mais leur sénescence observée après quelques passages successifs en limite l'utilisation. Pour pallier ce problème expérimental, une nouvelle lignée cellulaire appelée TWNT-4 a pu être générée par l'introduction du gène d'une télomérase-transcriptase inverse humaine (hTERT) à l'aide d'un vecteur rétroviral. Ces cellules ont depuis été utilisées afin d'évaluer les effets de molécules anti-fibrotiques (Zhen et al., 2006).

Les cellules GREF-X, spontanément immortalisées, sont des CEF isolées d'une résection de foie humain sain. Ces cellules proches des myofibroblastes expriment les collagènes de type I, IV, V et VI, la fibronectine, la laminine, la vimentine et l' $\alpha$ -SMA, et sécrètent de la MMP-2 (Weill et al., 1997). De plus, elles ont conservé la capacité de prendre en charge et estérifier le rétinol présent dans le milieu de culture (Weill et al., 1997).

La lignée hTERT-HSC a été développée en ciblant une meilleure stabilité des télomères et limiter ainsi la sénescence cellulaire. Elle provient de spécimens chirurgicaux de foie humain normal, infectées par un vecteur VSV-G encodant la « *human telomerase reverse transcriptase* » (hTERT) avec un promoteur de cytomégalovirus (Schnabl et al., 2002). Ces cellules produisent de l'IL-6, IL-8, IL-10, PDGFR $\alpha$  et  $\beta$ , de la GFAP, de la vimentine, de la fibuline 2. Ces cellules ont conservé la prise en charge du rétinol et son métabolisme (Schnabl et al., 2002).

Enfin, la lignée cellulaire de CEF humain la plus utilisée est la « Lieming Xu » (LX)-2, créée en même temps que la lignée LX-1. LX-1 et LX-2 ont été générés par transfection au TSV40, et dans le cas de la lignée LX-2 après mise en culture avec de faibles concentrations en sérum (Xu et al., 2005). Les deux lignées cellulaires présentent des phénotypes proches des CEF activés *in vivo*. Elles expriment le collagène de type I et IV, la fibronectine, l'endoglobine, la vimentine, la desmine, l' $\alpha$ -SMA, la GFAP, le CTGF, la survivine, p21, le  $\beta$ PDGFR, le récepteur du TGF- $\beta$  de types I et II, DDR2 et l'Ob-R<sub>L</sub> (Weiskirchen et al., 2013; Xu et al., 2005). La lignée LX-2, mais pas LX-1, sécrète de la MMP-2 ainsi que du TIMP-1 après stimulation par de la leptine (Xu et al., 2005). Les cellules LX-2 ont été récemment utilisées

pour étudier la sécrétion des composants de la matrice extracellulaire. Malgré leur phénotype activé, un comportement quiescent est observé lorsqu'elles sont cultivées sur du Matrigel® (Xu et al., 2005). Les cellules LX-2 sont considérées comme un modèle de choix dans l'étude des voies de signalisation impliquées dans l'activation des CEF (Cao et al., 2006).

#### 4.2.3- Co-cultures

Bien qu'elles soient utiles, les cultures impliquant un seul type cellulaire présentent des limites pour l'étude de l'activation des CEF et de la fibrose hépatique. En effet, ces monocultures ne prennent pas en compte les nombreuses interactions qui interviennent *in vivo* entre les différents types cellulaires, et qui sont pourtant critiques pour comprendre les mécanismes de la progression de la maladie. Ainsi, des modèles en co-cultures ont vu le jour. Les cellules dans ces configurations mixtes conservent leurs fonctionnalités pendant une longue durée. L'utilisation de co-cultures d'hépatocytes et de CEF primaires est rare compte tenu des difficultés d'obtention de CEF (Krause et al., 2009; Thomas et al., 2005). Les modèles les plus courants utilisent des lignées cellulaires de CEF en co-culture avec des hépatocytes (Abu-Absi et al., 2004). L'intérêt de cette co-culture est de conserver les CEF dans un état quiescent (Abu-Absi et al., 2004; Krause et al., 2009; Thomas et al., 2005). Ce système de co-culture a été amélioré en y appliquant différentes stratégies, incluant un ensemencement entre deux couches de composants de MEC ou bien des cultures en sphéroïdes, ce qui permet dans les deux cas de respecter l'architecture tridimensionnelle des cellules (Bhatia et al., 1999). Dans les co-cultures en sphéroïdes, une expression abondante des protéines de la MEC a été observée, ce qui suggère que les hépatocytes influencent la stabilité phénotypique des CEF (Thomas et al., 2005).

Récemment, ce système de co-cultures a permis de démontrer l'influence de la proximité entre ces deux cellules sur l'initiation du processus fibrotique induit par l'accumulation de lipides (Giraudi et al., 2015). De plus, des co-cultures entre des CEF primaires et des cellules de Kupffer ont permis de démontrer l'importance de ces interactions dans la régulation de la réponse fibrotique lors d'un processus inflammatoire (Nieto, 2006), tandis que des co-cultures de CEF et de cellules épithéliales ont montré l'importance de l'activation des CEF dans l'angiogénèse (Wirz et al., 2008).

#### 4.2.4- Tranches de foie

Les tranches de foie sont des systèmes largement utilisés pour les études *in vitro* de la fibrose hépatique. Par rapport aux co-cultures, elles présentent l'avantage de conserver les interactions complexes entre les cellules telles qu'elles existent *in vivo*. Ces tranches sont des biopsies de foie présentant en général une épaisseur de 100 à 250  $\mu\text{m}$  et un diamètre de 5 mm, ce qui permet à l'oxygène et aux nutriments du milieu de culture de diffuser. Elles peuvent être incubées dans des puits de culture et être incorporées dans un système de culture organique dynamique (Fisher and Vickers, 2013; Olinga et al., 1997). Dans ces cultures dynamiques, les tranches sont exposées de façon intermittente à des phases gazeuses ou du milieu de culture en les plaçant dans des fioles en verre. Des tranches de foies sains ou de foies fibrotiques peuvent être utilisées pour étudier respectivement les phases précoces et tardives de la fibrose hépatique (van de Bovenkamp et al., 2006; Guo et al., 2007; Westra et al., 2014). Ces tranches sont particulièrement intéressantes pour évaluer les différents mécanismes impliqués dans l'induction chimique et la réversion de la fibrose (Olinga and Schuppan, 2013). Le défaut général de ces cultures est leur durée de viabilité très limitée, restreignant leur usage à des investigations courtes (Westra et al., 2014).

#### 5- Diagnostique


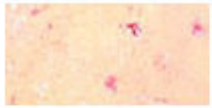





Avant la première moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, les maladies chroniques du foie ne pouvaient être diagnostiquées avec certitude qu'à un stade très avancé, généralement après l'apparition de la cirrhose (Lurie et al., 2015). Les premiers marqueurs non-invasifs quantifiables des maladies du foie étaient les niveaux sériques des enzymes hépatiques. Les mesures de phosphatase alcaline et de transaminases ont été développées respectivement en 1930 et 1955-1956.

La fibrose hépatique peut être estimée par des techniques telles que l'ultrasonographie, la tomographie et l'imagerie par résonance magnétique permettant de détecter des modifications du parenchyme (Hirata et al., 2001). Il est également possible d'estimer la fibrose par élastographie impulsionnelle à vibration contrôlée (FibroScan) qui détermine l'élasticité du foie. En effet, la rigidité du foie est corrélée à l'accumulation de composants de la MEC. Pour établir ces mesures, une onde sismique basse fréquence (50 Hz) est générée par un capteur ultrason à la surface de la peau. Cette technique est donc une alternative non invasive qui permettrait d'apprécier le développement fibrotique (**Figure 6**).



**Figure 6 - Principe de la sonde du Fibroscan.**

Les études noninvasives peuvent être complétées par des analyses tissulaires. Pour cela, le meilleur examen reste la biopsie hépatique (Afdhal and Nunes, 2004) mais cette méthode possède plusieurs limites. Tout d'abord, la biopsie est une technique invasive qui occasionne des douleurs chez environ 20% des patients et peut entraîner des complications sévères telles que des saignements ou une hémobilie dans 0,5% des cas (Cadranel et al., 2000). Ensuite, la petite taille des biopsies a tendance à induire des variabilités d'échantillonnage (Bedossa et al., 2003). Enfin, il peut y avoir des différences d'appréciation du stade fibrotique intra ou inter individuelles (Regev et al., 2002). Après coloration des coupes histologiques, il est possible de déterminer la localisation et l'importance de l'accumulation de la MEC, ainsi que le stade de nécroinflammation à l'aide des méthodes de classements telles que le score Metavir (stade 1 à 4) ou le score Ishak (stade I à V) (**Figure 7**). Pour cela, une coloration de la MEC est réalisée avec du rouge Sirius ou du trichrome de Masson, permettant de quantifier la quantité de collagène.

Appearance	Ishak stage: Categorical description	ISHAK	METAVIR
	No fibrosis (Normal)	0	F0
	Fibrosis expansion of some portal areas ± short fibrous septa	1	F1
	Fibrosis expansion of most portal areas ± short fibrous septa	2	F2
	Fibrosis expansion of most portal areas with occasional portal to portal(P-P) bridging	3	
	Fibrosis expansion of portal areas with marked portal to portal(P-P) bridging as well as portal to central(P-C)	4	F3
	Marked bridging (P-P and/or P-C) with occasional nodules (incomplete cirrhosis)	5	
	Cirrhosis, probable or definite	6	F4

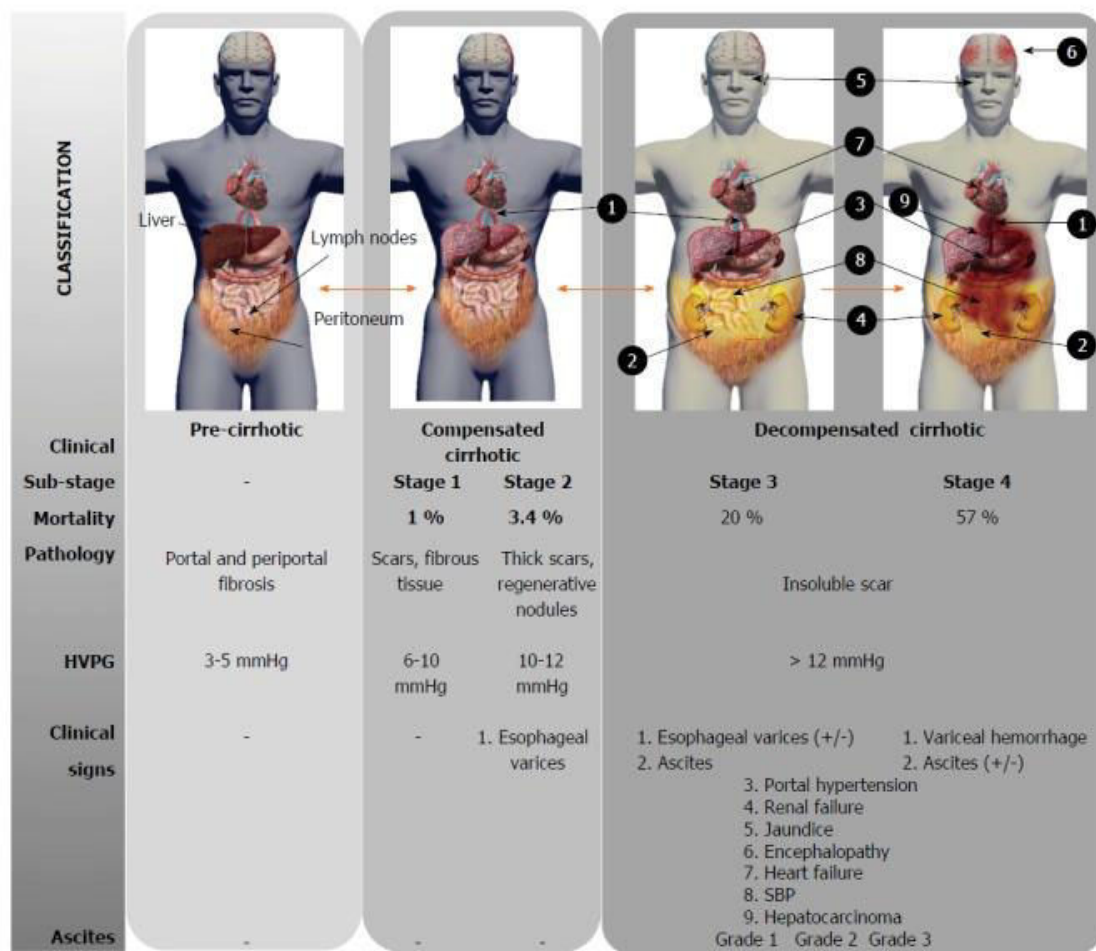
**Figure 7 - Système d'évaluation de la fibrose hépatique par la méthode Ishak et Metavir sur des coupes de foies après coloration au rouge Sirius.** La proportion de surface marquée positivement est de 1,9%, 3%, 3,6%, 6,5%, 13,7%, 24,3% et 27,8% à chaque niveau Ishak (Standish et al., 2006).

La détermination du stade fibrotique est une appréciation basée sur différents critères : la quantité de collagène, l'inflammation et la nécrose (**Figure 8**). Récemment il a été démontré que cette étape de coloration de la MEC peut être supprimée en utilisant des techniques d'imagerie multiphoton qui permet la visualisation du collagène fibrillaire sans marquage. La quantification automatisée et standardisée de la quantité de collagène permet l'évaluation du stade fibrotique.

Les techniques non invasives ont été développées qui visent à identifier à partir de prélèvements sanguins des marqueurs de la maladie. Ceux-ci sont représentatifs de défaillances fonctionnelles du foie, et non de l'accumulation de MEC. On retrouve la numération plaquettaire, les niveaux sériques d'aminotransférase, de prothrombine, et de

protéine de la phase aigüe. D'autres marqueurs sériques en relation directe avec la fibrose hépatique sont également dosés, tels que le pro-peptide N-terminal du collagène de type III, l'acide hyaluronique, le TIMP-1 et le YKL-40 (Rockey and Bissell, 2006). Mais en raison du manque de spécificité de la plupart, seul un petit nombre de ces marqueurs possède un intérêt en pratique clinique. Certains de ces marqueurs pourraient, de plus, être le reflet de la fibrose dans d'autres organes que le foie.

Pour améliorer les performances diagnostiques des tests, les travaux les plus récents évaluent des scores combinant plusieurs paramètres sanguins. Ces scores associent des paramètres dont les concentrations sériques augmentent à des paramètres dont les concentrations diminuent. Les meilleures méthodes actuelles dans ce cadre sont le Fibrotest combinant le dosage de 5 marqueurs (gamma-glutamyl transpeptidase, haptoglobine, bilirubine, apolipoprotéine A1, alpha-2-macroglobuline) et le test de fibrose hépatique amélioré réalisé à partir de 4 paramètres (propeptide N-terminal du collagène de type III, acide hyaluronique, TIMP-1 et âge du patient).



**Figure 8 - Progression et complications de la cirrhose du foie humain.** L'évolution de la pathologie cirrhotique, selon des critères cliniques, le taux de mortalité, les caractéristiques de la pathologie, l'*hepatic venous pressure gradient* (HVP), les signes et la présence d'ascite, est représentée. Le stade 1 (*stage 1*) dans la cirrhose compensée diffère du stade 2 par la présence de varices esophagiennes ainsi qu'une augmentation de la pression portale. Le stade 3 est caractérisé par la présence d'ascites et/ou de varices esophagiennes. Si une hémorragie des varices a lieu, la cirrhose passe au stade 4. La cirrhose peut être un processus réversible dans les stades précoces, comme indiqué par les flèches orange (SBP : *Spontaneous bacterial peritonitis*) (Martínez-Esparza et al., 2015).

## 6- Les traitements de la fibrose

La fibrose hépatique est une pathologie complexe faisant intervenir de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires. Ainsi, plusieurs stratégies peuvent être développées pour limiter son développement (**Tableau 1**).

## 6.1- Elimination des facteurs étiologiques

Retirer le facteur à l'origine des agressions responsables du développement fibrotique est la méthode la plus directe, et certainement la plus efficace, de traitement de la fibrose hépatique. Ainsi, les traitements contre les infections aux VHC et VHB (Başar et al., 2013; Berenguer and Schuppan, 2013), le sevrage alcoolique, le contrôle du poids corporel et des lipides dans le sang, la chélation de la surcharge en fer ou en cuivre (Hou et al., 2009), sont considérés comme des thérapies efficaces dans une large proportion des cas de fibrose hépatique. En particulier, les médicaments antiviraux tels que l'interferon (IFN)- $\alpha$ , la ribavirine, la lamivudine, l'adefovir, et l'entécavir exercent des effets anti-fibrotiques (Berenguer and Schuppan, 2013; Degertekin and Lok, 2009; Kim et al., 2010; Poynard et al., 2009; Ying et al., 2007).

## 6.2- Thérapies anti-inflammatoires et immunosuppressives

Les traitements anti-inflammatoires ou immunosuppresseurs sont des mesures importantes pour inhiber la fibrogénèse, et tout particulièrement les cas de fibrose et cirrhose induites lors d'une hépatite virale, d'une hépatite autoimmune, et d'une cholangite sclérosante primitive. Les antioxydants peuvent quant à eux combattre les effets des ERO et donc protéger des dommages hépatocytaires et exercer ainsi des effets anti-fibrotiques. Parmi ceux-ci, plusieurs compléments alimentaires et médicaments comme la S-adenosyl-L-méthionine, le silymarin, la phosphatidylcholine, la N-acetylcystéine, le resveratrol (Kawada et al., 1998), et la vitamine E (Sanyal et al., 2010) ont été testés dans des modèles animaux ou lors d'études cliniques chez l'Homme.

L'inflammation étant fortement associée à la progression de la fibrose hépatique, les effets de molécules anti-inflammatoires ont été étudiés. Ainsi, la corticothérapie seule ou en association avec l'azathioprine est efficace dans le traitement des hépatites autoimmunes (Ishibashi et al., 2007). Cependant la suppression de la fibrogénèse est souvent partielle et la fibrose hépatique continue d'évoluer malgré la présence des stéroïdes chez de nombreux patients (Albanis and Friedman, 2001). La colchicine et la rapamycine semblent posséder aussi des propriétés anti-inflammatoires, anti-fibrotiques et immunomodulatrices dans la fibrose hépatique. Cependant ces molécules se sont avérées décevantes lors d'essais cliniques. Il a été montré par exemple dans une revue sur 14 études contrôles et randomisées que la colchicine n'apportait pas de bénéfices clinique, biochimique ou histologique, voire qu'elle entraînait une augmentation



d'effets indésirables chez les patients souffrant de cirrhose alcoolique et non alcoolique (Rambaldi and Gluud, 2001).

Des avancées significatives devraient être apportées par le développement d'antagonistes de cytokines pro-inflammatoires et de leurs récepteurs. Le TNF- $\alpha$  joue un rôle important dans le développement de l'inflammation hépatique, et tout particulièrement dans les hépatites alcooliques. Des essais cliniques ont permis d'évaluer les effets de plusieurs composés anti-TNF- $\alpha$  (infliximab, etanercept, pentoxifylline). Le récepteur soluble du TNF- $\alpha$  présentait également un potentiel pour diminuer les dommages hépatiques (Bruck et al., 1997). L'anticorps humanisé monoclonal anti-TNF- $\alpha$ , l'infliximab, qui a fait ses preuves dans la maladie de Crohn, s'est montré prometteur dans le traitement de l'hépatite alcoolique aigüe (Tilg et al., 2003). Cependant certains essais cliniques ont dû être stoppés car ces traitements ont entraîné des effets secondaires importants. De plus, l'etanercept, un récepteur soluble du TNF- $\alpha$ , administré chez des patients atteints d'une hépatite alcoolique sévère ou modérée, n'avait pas d'impact sur la mortalité lors du premier mois, et plus grave, les taux de mortalité chez les patients traités au-delà de 6 mois étaient beaucoup plus élevée, effet attribué à l'augmentation des risques d'infections (Boetticher et al. 2008). Pour sa part, la pentoxyphylline réduit la mortalité à court-terme dans une étude de l'hépatite alcoolique aigüe sévère, sans pour autant démontrer d'action anti-fibrotique (Akriviadis et al. 2000).

Le blocage de l'IL-1 $\beta$ , une autre cytokine pro-inflammatoire importante, par l'utilisation d'un ADNc de l'*interleukin-1 receptor antagonist* (IL-1Ra) permettant de bloquer le récepteur à l'IL-1 a permis de réduire les dommages et les niveaux de cytokines pro-inflammatoires, avec une meilleure survie dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rongeur (Harada et al., 2002). Dans une autre étude, l'utilisation de l'anakinra, un antagoniste du récepteur à l'IL-1 $\beta$ , dans un modèle de stéatohépatite alcoolique chez la souris a permis de réduire la stéatose, les dommages hépatocytaires et l'inflammation du foie (Petrasek et al., 2012). A l'heure actuelle, aucune étude clinique visant la signalisation de l'IL-1 $\beta$  n'a été engagée chez l'Homme.

### 6.3- Inhibition de l'activation des CEF et de ses effecteurs

Comme détaillé plus tard, l'activation des CEF, leur prolifération et la fibrogénèse sont des étapes pivots dans le développement de la fibrose hépatique. Ainsi les mécanismes à l'origine de ces processus sont des cibles de choix dans la thérapie de la fibrose hépatique (Bataller and Brenner, 2001).

L'inactivation des cellules CEF peut être obtenue en inhibant les voies de signalisation du TGF- $\beta$ 1 et du PDGF-B, et les CEF activées peuvent être éliminées en favorisant leur apoptose. Certaines cytokines et des facteurs de croissance tels que l'IGF-1, l'IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  ont montré leur capacité à induire l'apoptose des CEF (Saile et al., 2004a, 2004b; Tomita et al., 2006). Les inhibiteurs de l'I $\kappa$ B kinase ont également montré leur capacité à induire l'apoptose des CEF et exercer des effets anti-fibrotiques.

La fibrose hépatique est habituellement à un stade avancé au moment du diagnostic et la dégradation du tissu cicatriciel existant est un élément critique à prendre en compte pour développer une thérapie anti-fibrotique. La dégradation de la matrice fibrotique peut être induite par la modulation de la balance entre les MMP et leurs inhibiteurs, les TIMP, soit en augmentant l'activation des MMP ou bien en diminuant l'activité des TIMP. Des études réalisées dans des modèles de fibrose hépatique chez l'animal ont apporté la preuve de concept de certains agents. Par exemple, l'administration directe d'ARNm codant pour la MMP-1 *via* un vecteur adénoviral atténue l'établissement de la fibrose hépatique chez le rat en réponse au TAA. Dans une autre étude, l'administration d'un anticorps dirigé contre le TIMP-1 diminue l'activation des CEF et atténue la fibrose hépatique induite par le CCl<sub>4</sub> chez le rat (Imuro et al., 2003; Parsons et al., 2004).

**Tableau 1 - Thérapies potentielles de la fibrose hépatique.**

Cibles mécanistiques	Exemples
Traiter de la cause primaire	<ul style="list-style-type: none"><li>- Retirer l'agent à l'origine des lésions (exemple : l'alcool)</li><li>- Thérapies anti-virales pour l'hépatite B ou C</li></ul>
Supprimer l'inflammation hépatique	<ul style="list-style-type: none"><li>- Les corticostéroïdes</li><li>- Les antagonistes du TNF-<math>\alpha</math> (exemples : infliximab, thalidomide)</li><li>- Les antagonistes de l'IL-1 (exemple : Anakinra)</li><li>- IL-10</li></ul>
Inhiber l'activation des CEF	<ul style="list-style-type: none"><li>- Antioxydants (exemples : vitamine E, phosphatidylcholine)</li><li>- IFN-<math>\gamma</math></li><li>- Glitazones</li><li>- Trichostatine A</li></ul>
Inhiber la prolifération des CEF	<ul style="list-style-type: none"><li>- Antagonistes du PDGF</li><li>- Analogue de la fumigilline</li></ul>
Diminuer la fibrogénèse des CEF	<ul style="list-style-type: none"><li>- Antagonistes du TGF-<math>\beta</math></li><li>- Inhibiteurs de l'ACE</li><li>- Antagonistes du récepteur AT<sub>1</sub></li></ul>
Augmenter la dégradation de la matrice	<ul style="list-style-type: none"><li>- MMP</li><li>- Antagonistes du TIMP</li><li>- uPA</li></ul>
Promouvoir l'apoptose des CEF	<ul style="list-style-type: none"><li>- Ligand du FAS</li><li>- NGF</li><li>- Benzodiazepines</li><li>- Gliotoxine</li><li>- Sulphasalazine</li></ul>

**B- Mécanismes cellulaires et moléculaires de la fibrose**

Le développement de la fibrose hépatique survient dans un contexte de pathologies ou d'atteintes chroniques de l'organe, où les dommages répétés provoquent un défaut de

régénération du tissu hépatique et donc l'activation d'un processus de cicatrisation tissulaire par de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires. Cette pathologie se développe en deux temps, avec une première phase aigüe inflammatoire suivie d'une phase chronique de fibrogénèse, médiées respectivement par les macrophages et les fibroblastes hépatiques.

#### 1- La phase inflammatoire : rôle des macrophages

De nombreuses études ont montré que le système immunitaire jouait un rôle dans la progression ou la régression de la fibrose hépatique (Schuppan and Kim, 2013; Seki and Schwabe, 2015). L'une des cellules la plus étudiée dans cette pathologie est le macrophage. Dans un foie fibrotique, les macrophages sont localisés à proximité des myofibroblastes activés dans des zones de tissus cicatriciels (Liu et al., 2010). Les éléments ayant permis de démontrer le rôle fonctionnel des macrophages dans la fibrose proviennent d'études *in vivo* dans des modèles impliquant la déplétion des populations de macrophages ou lors de stratégies de blocage de ces cellules. Par exemple, l'administration de gadolinium chloride qui permet la déplétion des macrophages hépatiques chez le rat entraîne une diminution de l'activation des myofibroblastes et une réduction de la progression de la fibrose en réponse au TAA (Ide et al., 2005). Une étude importante a été réalisée chez des souris transgéniques Cd11b-DTR chez qui une fibrose hépatique a été induite par le CCl<sub>4</sub> (Duffield et al., 2005). Chez ces animaux, la déplétion des macrophages a été effectuée soit pendant l'administration du CCl<sub>4</sub>, soit pendant la phase de réparation tissulaire après l'arrêt du traitement au CCl<sub>4</sub>. Il a alors pu être démontré que lorsque la déplétion intervenait pendant la phase d'agression au CCl<sub>4</sub>, le nombre de myofibroblastes, provenant de la différenciation de CEF, était diminué de même que le taux de fibrose hépatique montrant le rôle pro-fibrogénique des macrophages dans ce contexte. A l'inverse, la déplétion des macrophages pendant la phase de résolution de la fibrose induit un retard de réparation, suggérant que dans un contexte différent, les macrophages peuvent également avoir un rôle régulateur de la fibrose. De façon similaire, l'utilisation de liposomes enrichis en clodronate dans des modèles de souris transgéniques traitées au CCl<sub>4</sub> ou ayant subi une ligature du canal biliaire, ont montré l'importance des cellules dans la progression de la pathologie (Gehring et al., 2006; Sato et al., 2014).

Il existe une grande hétérogénéité de macrophages selon l'origine des cellules ou le contexte activateur. Des études ont été menées pour savoir s'il existait un profil déterminé de macrophages dans le foie qui lui confère un rôle pro-fibrotique. Dans cet organe, les macrophages sont généralement définis comme résidents (cellules de Kupffer) ou dérivés de

monocytes. Il est important de noter que les cellules de Kupffer sont localisées dans les sinusoides hépatiques, ce qui leur permet de capter directement les antigènes provenant du tractus gastrointestinal de la veine porte. Ce sont également les premières cellules au contact des bactéries pathogéniques et celles qui vont interagir avec les autres cellules immunitaires circulantes. Les cellules de Kupffer assurent donc un rôle important dans l'homéostasie et la protection de l'organe et sont capables d'induire des réponses immunitaires immunogéniques ou tolérogéniques. A l'état de repos, les macrophages hépatiques dérivants des monocytes peuvent également être observés dans le foie, mais représentent une plus faible population (Ramachandran et al., 2012) et sont localisés en zone perivasculaire (Yona et al., 2013).

En réponse à des lésions hépatiques, les populations de macrophages évoluent fortement. Les cellules de Kupffer résidentes ont probablement un rôle dans la réponse initiale aux lésions, en sécrétant des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires, comme le CCL2 et le CCL5 (Tacke and Zimmermann, 2014). Cependant le nombre de cellules de Kupffer diminue pendant l'inflammation hépatique et la fibrogénèse, puis cette population cellulaire se renouvelle à mesure que l'inflammation et la fibrose se résolvent (Holt et al., 2008; Ramachandran et al., 2012). Actuellement les raisons de cette disparition cellulaire (que ce soit par mort cellulaire ou migration des cellules du foie pour présenter les antigènes) puis de sa reconstitution (par expansion locale ou recrutement de monocytes) ne sont pas totalement élucidées. Inversement, le nombre de macrophages provenant de la différenciation des monocytes augmentent fortement en réponse aux lésions hépatiques, ce qui suggère que les macrophages pro-fibrogéniques doivent dériver de ces populations. Dans une étude cruciale, une population de macrophage LY6C<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> produisant la forme inducible de la *nitric oxide synthase* (iNOS), et dérivant du recrutement sous l'influence du CCR2 des monocytes inflammatoires LY6C<sup>hi</sup> a été identifiée comme la population la plus pro-fibrogénique dans un modèle de fibrose hépatique induite par le CCl<sub>4</sub> chez la souris (Karlmark et al., 2009). De plus, les macrophages ont été identifiés comme potentiels effecteurs pro-fibrotiques dans d'autres tissus fibrotiques tels les reins (Lin et al., 2009), le cœur (Hayashidani et al., 2003), les poumons (Gibbons et al., 2011) et la peau (Lucas et al., 2010). Comme pour le foie, les macrophages dérivants de monocytes LY6C<sup>hi</sup> ont été montrés comme étant la population prédominante de macrophages pro-fibrogéniques dans ces tissus (Gibbons et al., 2011; Lin et al., 2009).

Ainsi, il semblerait que le recrutement des monocytes est essentiel à la fibrogénèse hépatique. Par ailleurs, certaines études ont montré que l'inhibition du facteur principal chimioattractant

des monocytes, CCL2, chez le rat, ou que la délétion génétique du récepteur CCR2 chez la souris, permettaient de diminuer l'infiltration des macrophages en réponse à des lésions du foie, accompagnée d'une forte diminution de la fibrose (Imamura et al., 2005; Mitchell et al., 2009). Il a été démontré dans d'autres organes que la prolifération locale des macrophages jouait également un rôle dans la réponse immunitaire innée associée à une inflammation chronique. En particulier, dans les maladies liées aux cellules T helper 2 (T<sub>H</sub>2), telles que certaines infections parasitaires des poumons par exemple, une prolifération des macrophages résidents du tissu sous l'influence de l'IL-4 est mesurée (Jenkins et al., 2011). Par ailleurs, des études ont montré la capacité des macrophages dérivants des monocytes à proliférer *in situ* dans le contexte de l'athérosclérose (Robbins et al., 2013) ou encore de l'inflammation péritonéale (Davies et al., 2013). Ainsi il est donc peu surprenant que, dans le cas d'inflammation hépatique chronique induite par le CCl<sub>4</sub>, l'activité proliférative mesurée par le marquage du KI67 ait pu être détectée à la fois pour les cellules de Kupffer et pour les macrophages dérivants des monocytes (Ramachandran et al., 2012). La population de macrophages pro-fibrogéniques LY6C<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> est la population de macrophage la plus proliférative dans ce contexte, ce qui souligne l'importance de cette population dans la réponse cicatricielle dépendante des macrophages.

Actuellement, les études se focalisent sur la compréhension des mécanismes par lesquels les macrophages induisent une réponse fibrotique dans le foie. Les macrophages peuvent produire une variété de cytokines et de chimiokines ainsi que d'autres médiateurs solubles qui influencent directement le comportement des CEF et des autres myofibroblastes. Notamment il est intéressant de constater que les macrophages expriment du TGF- $\beta$  qui conduit à l'activation des myofibroblastes et à la synthèse de MEC (Karlmark et al., 2009; Wynn and Barron, 2010). De plus, les macrophages pro-fibrogéniques LY6C<sup>hi</sup> expriment fortement la « TGF- $\beta$ -activating protein » thrombospondine 1 (Ramachandran et al., 2012). Les macrophages peuvent également exprimer le mitogène PDGF et les cytokines de la réponse T<sub>H</sub>2, IL-4 et IL-13, qui stimulent directement la synthèse du collagène par les myofibroblastes. Les macrophages produisent par ailleurs des cytokines, dont le CCL8 (également appelé MCP2) et le CCL7 (connu comme MCP3) (Wynn and Barron, 2010), qui peuvent recruter les myofibroblastes, puis le CCL2, CCL3 et CCL5, qui facilitent le recrutement des leucocytes (Liaskou et al., 2013) aux sites inflammatoires, perpétuant ainsi la réponse fibrotique.

## 2- Le développement de la fibrose : rôle des cellules étoilées du foie

### 2.1- Les cellules étoilées du foie dans la physiologie

Les CEF, également appelées « cellules de stockage de lipides », « cellules de Ito », « lipocytes », « cellules périsinusoïdales », ou encore « cellules riches en vitamine A », sont localisées dans l'espace de Disse où, dans un foie normal, elles contribuent au développement du foie, au métabolisme des rétinoïdes, à l'homéostasie de la matrice extracellulaire et à la sécrétion de nombreux médiateurs, comme décrit précédemment.

#### 2.1.1- Rôles dans le développement du foie

Les CEF sécrètent un morphogène, la pleiotrophine, qui contribue à l'organogénèse et à la régénération hépatique (Asahina et al., 2002). Elles expriment également l'épimorphine, une protéine morphogénique mésenchymale impliquée dans la différenciation des cellules souches hépatiques de rat (Miura et al., 2003). Les précurseurs des cellules CEF, isolés d'un foie fœtal, présentent de fortes activités prolifératives, une capacité importante à produire le facteur de croissance hépatocytaire (*hepatocyte growth factor*, HGF), le CXCL12, et des facteurs de transcription *homeobox*, indiquant leurs contributions potentielles au développement hépatique et à l'hématopoïèse (Kubota et al., 2007).

#### 2.1.2- Métabolisme des rétinoïdes

Les CEF constituent la plus grande réserve de rétinoïdes du corps humain (environ 60%) (Wake, 1971). Les rétinoïdes de l'alimentation sont absorbés par l'intestin et transportés sous forme d'esters de rétinol aux hépatocytes, où ils sont hydrolysés en rétinol libre par l'action d'une lipase. Le rétinol est transféré aux cellules étoilées où il peut être ré-estérifié (Hendriks et al., 1985). Le stockage des rétinoïdes se fait dans des gouttelettes qui contiennent également des triglycérides, des phospholipides, du cholestérol, et des acides gras (Moriwaki et al., 1988; Yamada et al., 1987).

#### 2.1.3- Homéostasie de la matrice extracellulaire

Dans un foie normal, la MEC compte pour environ 0,5% de la masse totale du foie (Rojkind et al., 1979) distribuée au niveau des espaces portes, des veines centrales et de la capsule de Glisson, avec seulement une faible proportion présente dans l'espace de Disse (Geerts et al., 1991). La composition normale de la matrice extracellulaire inclut des collagènes (de type I, III, IV, V, VI, XIV, and XVIII), de l'élastine, des glycoprotéines (laminine, fibronectine,

nidogene/entactine, osteopontine, des protéines riches en cystéine), des protéoglycanes (heparane sulfate, chondroïtine 4-sulfate, chondroïtine 6-sulfate, dermatane sulfate, syndecane, biglycane, et decorine), et de l'acide hyaluronique (Frizell et al., 1995; Kawashima et al., 1999; Schuppan, 1990). Bien que présente en modeste quantité, la MEC de l'espace de Disse joue un rôle important dans la préservation de l'homéostasie du foie et possède un profil de localisation unique. Le collagène de type IV est principalement localisé entre les cellules endothéliales et les CEF, alors que les collagènes fibreux de type I et III sont localisés entre les CEF et les hépatocytes (Bissell et al., 1987; Friedman et al., 1989). Pour l'essentiel, la composition de la MEC peut affecter le comportement des cellules environnantes par l'intermédiaire de récepteurs de surfaces cellulaires, et plus particulièrement des intégrines, dont les CEF expriment les formes  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 2$  (Racine-Samson et al., 1997),  $\alpha v\beta 6$  (Popov et al., 2008),  $\alpha 5\beta 1$  (Huang and Brigstock, 2011), et également la kinase liée aux intégrines (Shafiei and Rockey, 2012). Les trois types cellulaires présents autour de l'espace de Disse (hépatocytes, cellules endothéliales, CEF) produisent du collagène de type I mais les hépatocytes sécrètent avant tout de la fibronectine (Ramadori et al., 1989), les cellules endothéliales expriment le collagène de type IV, et les CEF quiescentes, la laminine et des collagènes de type III et IV (Geerts et al., 1989; Maher and McGuire, 1990). Le maintien de l'homéostasie de la matrice extracellulaire est assuré par un équilibre entre la production de ses composants et leur dégradation. Les MMP sont les principaux effecteurs de cette dégradation, et leur activité est régulée par des inhibiteurs endogènes, les TIMP. Plusieurs populations cellulaires du foie sont capables de produire à la fois des MMP et des TIMP (Arthur et al., 1989; Knittel et al., 1999).

#### 2.1.4- Sécrétion de médiateurs

Alors que les molécules dérivées des cellules étoilées sont de puissants inducteurs de la fibrose hépatique, elles pourraient également jouer un rôle important dans l'homéostasie du foie et promouvoir sa régénération même si ce rôle n'est pas encore clairement établi. En condition quiescente, les CEF sont capables de sécréter les molécules décrites dans les paragraphes ci-dessous.

##### \* Facteurs de croissance

L'HGF est le principal mitogène des hépatocytes (Schirmacher et al., 1993). Les cellules CEF quiescentes peuvent en produire, mais de façon intéressante, lors de lésions hépatiques, son expression est diminuée dans les CEF par l'action du TGF- $\beta$  (Ramadori et al., 1992). Cette



régulation pourrait expliquer la diminution du taux de régénération hépatique dans un foie fibrotique ou endommagé.

Le TGF- $\beta$  fait partie des cytokines les plus importantes pour réguler le phénotype des CEF (Bissell et al., 1995; Dooley et al., 2000). Dans un foie normal, l'expression des différentes isoformes du TGF- $\beta$  (TGF- $\beta_{1,2,3}$ ) est partagée entre les hépatocytes, les cellules de Kupffer et les CEF (Bissell et al., 1995). Alors que le TGF- $\beta_1$  est plus fortement exprimé par les cellules de Kupffer que les CEF, le TGF- $\beta_3$  est uniquement exprimé dans ces dernières (De Bleser et al., 1997). Dans tous les cas, le TGF- $\beta$  est sécrété sous forme latente et nécessite une activation pour exercer son action. Les voies prédominantes d'activation du TGF- $\beta$  diffèrent selon les différents tissus. Dans le foie, les intégrines, le fibrinogène, et les activateurs de plasminogène de type urokinase, parmi d'autres, peuvent activer le TGF- $\beta$  latent lors d'atteintes hépatiques, ce qui peut conduire à l'activation des CEF (Botella et al., 2002; Racine-Samson et al., 1997; Stärkel et al., 2003). Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire « VEGF » est également exprimé par les CEF quiescentes (Ishikawa et al., 1999). Son potentiel mitogène envers les cellules sinusoïdales et endothéliales souligne le rôle clé des CEF dans la communication et le contrôle de l'homéostasie du foie. La voie de signalisation paracrine importante entre les CEF et l'endothélium sinusoïdal, induite par le VEGF et la guanylate cyclase soluble pourrait être essentielle pour l'homéostasie sinusoïdale dans le foie normal et la régénération (Wang et al., 2012a, 2012b; Xie et al., 2012). Les autres facteurs de croissance synthétisés par les CEF sont les IGF, le TGF- $\alpha$ , l'EGF, le facteur de croissance des cellules souches, et le facteur de croissance des fibroblastes, cependant leurs contributions est plus importante lors du développement du foie et de sa régénération (Chan et al., 2013; Chen et al., 2012b; Fujio et al., 1994; Marsden et al., 1992; Meyer et al., 1990; Mullhaupt et al., 1994; Rosenbaum et al., 1995; Tsukamoto et al., 2012; Zindy et al., 1992).

#### \* Autres médiateurs

L'endothéline-1 (ET-1) est un vasoconstricteur puissant produit majoritairement par les cellules endothéliales dans un foie normal (Yanagisawa et al., 1988), mais également par les CEF. De façon intéressante, pendant les dommages hépatiques, les cellules endothéliales diminuent la sécrétion d'ET-1 et les CEF en deviennent la principale source et cet événement est corrélé avec leur activation (Khimji and Rockey, 2011; Pinzani et al., 1996; Rockey et al., 1998; Shao et al., 1999). De plus, les CEF humaines possèdent le récepteur fonctionnel de l'adrénomédulline (ADM), un peptide produit par la plupart des cellules contractiles, qui

régule l'effet contractile de l'ET-1 (Görbig et al., 2001). Dans des conditions basales, l'ADM est sécrétée par les CEF et sa production est profondément augmentée par les cytokines (Görbig et al., 2001). L'ADM peut également atténuer l'activation des CEF en inhibant la production de TGF- $\beta$ 1 et la production de MMP-2 (Wang et al., 2006). Ces résultats suggèrent que l'ADM régule l'activation et la contractilité des cellules étoilées de façon autocrine.

#### 2.1.5- Métabolisme des médicaments et détoxification

Bien que ce rôle soit surtout associé aux hépatocytes, les CEF expriment également des enzymes de métabolisme et notamment l'alcool- et l'acétaldéhyde-déhydrogénase, mais pas le CYP2E1 (Casini et al., 1998). Les autres isoformes de CYP sont exprimées par les CEF, et sont diminuées pendant l'activation cellulaire (Yamada et al., 1997) ; toutefois, leurs rôles dans les cellules quiescentes ou activées ne sont pas élucidés.

#### 2.2- Les cellules étoilées du foie dans la fibrose

De nombreux mécanismes permettent aux CEF d'acquérir un phénotype activé. De simple cellules responsables du stockage de la vitamine A, elles deviennent des myofibroblastes à l'origine du développement de la fibrose dans le foie (**Figure 9**).

##### 2.2.1- Activation

Les agressions chroniques entraînent au niveau du foie des dommages au niveau du parenchyme, une augmentation de corps apoptotiques, l'activation des cellules de Kupffer, la production d'ERO, et un remodelage de la MEC. Cet ensemble joue un rôle déclencheur dans l'activation des fibroblastes. Cette dernière survient en deux phases, l'initiation et la perpétuation, qui peuvent être accompagnées d'une troisième phase de résolution, si les agressions cessent. Lors de la phase de résolution de la fibrose, la perte de l'activation des fibroblastes peut se dérouler de nombreuses manières, la voie apoptotique n'étant pas le seul mécanisme possible. Il a ainsi été montré que les CEF peuvent également entrer en sénescence ou même revenir à un état quiescent (Friedman, 2012; Kisseleva et al., 2012; Troeger et al., 2012).

L'initiation des CEF induit un changement de phénotype et des modifications de l'expression des gènes qui rendent les cellules plus réceptives aux modifications de leur environnement ainsi qu'aux stimuli du foie malade. L'un des premiers signaux permettant l'initiation des CEF

est la stimulation paracrine par les cellules voisines (cellules endothéliales, plaquettes, cellules immunitaires, et hépatocytes) ainsi que les modifications du tissu conjonctif entourant les CEF. Les cellules endothéliales peuvent activer les CEF en sécrétant de la fibronectine (Jarnagin et al., 1994) ainsi qu'en activant le TGF- $\beta$  latent (Kojima et al., 2000), mais également en sécrétant un large spectre de médiateurs qui régule la réponse inflammatoire et participe à la communication cellulaire (Smedsrød et al., 2009; Xie et al., 2012). Les effets de la fibronectine sont largement promigratoire et non fibrogénique, suggérant que la migration des CEF est une première étape importante dans la réponse aux dommages (Olsen et al., 2012). Les plaquettes contribuent également en sécrétant du TGF- $\beta$ , ainsi que de l'EGF et le PDGF, le mitogène le plus important des CEF (Bachem et al., 1989; Borkham-Kamphorst et al., 2007). Cependant, dans l'ensemble, la population de macrophages résidents du foie pourrait être la source principale de PDGF, ainsi que des autres médiateurs paracrines qui conduisent à l'activation des CEF (Heymann et al., 2009; Wang et al., 2009).

### 2.2.2- La prolifération

Le PDGF est le mitogène principal des cellules étoilées pendant les dommages hépatiques. L'augmentation de la sécrétion du PDGF dans le foie combinée à l'augmentation de l'expression de son récepteur dans les CEF leur confère un phénotype profibrogénique (Borkham-Kamphorst et al., 2007; Pinzani, 2002; Wong et al., 1994). La signalisation du TNF- $\alpha$  contribue à la prolifération induite par le PDGF par l'intermédiaire du récepteur 1 au TNF (Tarrats et al., 2011). Les cellules étoilées sont également sensibles à une large gamme de facteurs incluant le VEGF (Yoshiji et al., 2003), la thrombine, l'EGF, le facteur de croissance des kératinocytes (Steiling et al., 2004), et le bFGF, de l'anglais *fibroblast growth factor* (Yu et al., 2003). Parmi ceux-ci, le VEGF est l'une des cytokines majeures sécrétées par les cellules étoilées activées, qui ont à la fois des fonctions d'angiogénèse et de fibrogénèse (Coulouarn et al., 2012; Kaur et al., 2012; Lee et al., 2007). La production de VEGF est dépendante de la surexpression de la protéine COX-2 par l'activation de phospho-p42/44 MAP kinase (Zhao et al., 2012). Une conclusion soulignée par plusieurs études impliquant les cellules étoilées dans le développement et la croissance des tumeurs primaires et métastatiques a montré que, dans l'ensemble, les cellules étoilées contribuent à la fois à la réparation tissulaire et à la croissance tumorale (Dapito et al., 2012; Kang et al., 2011; Olaso et al., 2003).

Les TIMP jouent un rôle pro-fibrotiques de par leur activité inhibitrice de la dégradation de la matrice, et de plus, ils favorisent la survie des cellules étoilées. L'augmentation de l'expression du TIMP-1 par les cellules étoilées induit également la prolifération des cellules étoilées de façon dépendante de la voie AKT (Fowell et al., 2011).

### 2.2.3- La contraction

La contraction des CEF semble être l'un des événements précoces de l'hypertension portale observée chez les patients atteints d'une maladie hépatique à un stade avancé. Les facteurs conduisant à l'hypertension portale incluent une augmentation du flux sanguin, une augmentation de la résistance intrahépatique, et une désorganisation de l'architecture du foie. Lors de lésions tissulaires, les sinusoides hépatiques subissent des changements conduits par les CEF à la fois morphologiques et fonctionnels. Un remodelage drastique a lieu, caractérisé par le dépôt de collagène matriciel, une perte de la fenestration et une augmentation de la densité en CEF contractiles (Thabut et al., 2011). De plus, on constate un déséquilibre des forces vasoactives caractérisé par un déficit en production de monoxyde d'azote et une augmentation des substances vasoconstrictives telles que l'ET-1, l'angiotensinogène II, les eicosanoïdes, le peptide natriurétique atrial, la somatostatine et le monoxyde de carbone (Reynaert et al., 2002; Rockey, 2001, 2003; Taura et al., 2008). Ensemble, ces facteurs conduisent à une augmentation de la résistance sinusoidale et l'hypertension portale.

L'adénosine joue un rôle important dans la différenciation des CEF, leur prolifération, et dans la production de collagène de type I. Malgré ces effets pro-fibrotiques, l'adénosine inhibe la contraction des CEF (ainsi que le chimiotactisme) par la perte des fibres de stress d'actine. L'adénosine via les récepteurs A2a entraîne une activation de la PKA et une inhibition de RhoA (Sohail et al., 2009). La protéine RhoA est ainsi une cible thérapeutique potentielle pour l'hypertension portale (Kageyama et al., 2012). L'adénosine conduit ainsi des effets à la fois agressifs et protecteurs sur les CEF. Comprendre ces fonctions permettrait de développer des molécules anti-fibrotiques.

### 2.2.4- Dégradation de la matrice extracellulaire

La fibrose est un processus dynamique qui implique une production excessive de composants de la MEC mais aussi leur dégradation. La fibrose hépatique est caractérisée par le remplacement progressif de la membrane basale normale, composée de collagène de type IV, par du tissu cicatriciel qui contient essentiellement des fibres de collagène de type I. La

dégradation précoce de la matrice est une étape importante de la fibrose et semble être une étape clé pour induire la migration des CEF vers les sites de lésions. Les CEF eux-mêmes sont les principales sources de MMP-2, MMP-9 et MMP-13 (Arthur et al., 1992; Han et al., 2007; Milani et al., 1994; Vyas et al., 1995), qui ont des fonctions de collagénases interstitielles et de gélatinases.

Malgré l'implication des MMP dans la progression de la fibrose, ces molécules peuvent paradoxalement montrer des propriétés anti-fibrotiques. La MMP-2 inhibe la production de collagène de type I par les CEF et les souris déficientes en MMP-2 ont ainsi montré une fibrose hépatique augmentée (Radbill et al., 2011). De plus, la MMP-2 est capable de réguler l'apoptose des CEF en clivant le domaine extracellulaire de la cadhérine, allant dans le sens d'un rôle anti-fibrotique (Hartland et al., 2009). Certaines activités paradoxales des MMP *in vivo* pourraient être expliquées par leur action simultanée sur l'activation des macrophages (Gong et al., 2008), une composante souvent négligée pour interpréter leur contribution dans la fibrose. La régulation de l'expression de MMP a lieu par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes. Les TIMP, qui sont majoritairement exprimés par les CEF, se lient aux MMP pour les inactiver. De plus, pendant la progression de la fibrose, la MMP-9 et la MMP-13 sont séquestrées au niveau de la chromatine empêchant l'accès des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1. Une perturbation de l'acétylation des histones est associée à l'extinction permanente de l'expression des gènes et les CEF activées présentent une augmentation globale de l'histone déacétylase-4, ce qui entraîne une diminution de l'acétylation de la région promotrice de la MMP-9 et la MMP-13, et donc la répression des gènes (Qin and Han, 2010).

Bien que la source des enzymes qui dégradent la MEC dans le foie soit incertaine, les découvertes s'orientent vers une sous-population de macrophages ayant un potentiel fibrolytique. En effet, une étude récente a conduit à la caractérisation d'un sous-type spécifique de macrophages exprimant le marqueur de surface Ly6C qui sécrètent un panel de protéases ayant la capacité de dégrader la matrice extracellulaire (Ramachandran and Iredale, 2012; Ramachandran et al., 2012).

#### 2.2.5- La fibrogénèse

La production de matrice extracellulaire, en particulier le collagène de type I, est un marqueur de cellules étoilées activées. La production du collagène de type I est régulée à la fois de manière transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (Lindquist et al., 2000; Manojlovic and Stefanovic, 2012; Parsons et al., 2011; Stefanovic et al., 1997, 1999). Le TGF- $\beta$ 1 est le

contributeur majeur de ce processus par des voies autocrines ou paracrines qui stimulent la production de MEC. Une autre cytokine fibrotique bien caractérisée est le CTGF/CCN2. Les niveaux de CTGF sont augmentés dans le foie endommagé et cette cytokine induit un large spectre d'activités pro-fibrotiques dans les cellules étoilées, médié par les récepteurs couplés aux protéines G (Gao and Brigstock, 2004; Gressner and Gressner, 2008; Huang and Brigstock, 2012). Le CTGF représente une cible intéressante en matière de stratégie anti-fibrotique, car contrairement à l'antagonisme du TGF- $\beta$ 1, l'inhibition du CTGF ne devrait pas avoir d'impact sur la croissance des hépatocytes ou conférer un risque de cinogénèse.

La liste des autres facteurs qui contribuent à la fibrogénèse est de plus en plus importante, incluant des molécules de signalisation, des chimiokines, des molécules de stress cellulaire (Sahin et al., 2010). Par exemple, l'ostéopontine, une molécule d'adhérence produite par les cellules étoilées, active l'expression du collagène de type I *via* l'engagement de l'intégrine  $\alpha$ (V) $\beta$  et l'activation de la voie de signalisation PI3K/pAkt/NF- $\kappa$ B (Urtasun et al., 2012). A ajouter à cela, la récente identification de récepteurs aux chimiokines profibrotiques à la surface des cellules étoilées, incluant le CXCR4 (Hong et al., 2009), le CCR1, le CCR5 (Seki et al., 2009a), le CXCR2 (Stefanovic et al., 2005), et le CCR2 (Seki et al., 2009b), inclue d'avantages de signaux pour promouvoir l'activation des ces cellules.

#### 2.2.6- Le chimiotactisme

Le chimiotactisme des cellules étoilées est un évènement important de la génération d'un septa fibrotique. Les cellules étoilées expriment un large panel de récepteurs aux médiateurs chimiotactiques. Les plus impliqués dans ce phénomène sont le PDGF (Ikeda et al., 1999; Kinnman et al., 2000), le VEGF, l'Ang-1 (Novo et al., 2007), le TGF- $\beta$ 1, l'EGF (Yang et al., 2003), le bFGF (Fibbi et al., 2001), le CCL2 (Marra et al., 1999), et le CXCR4 (Sawitza et al., 2009) et des ligands spécifiques du CXCR3 (Bonacchi et al., 2001). La signalisation oxydante contribue à ces réponses. Plus précisément, de nombreux signaux chimioattractants (PDGF, VEGF, et CCL2) augmentent les taux d'ERO intracellulaires *via* la NADPH oxydase et l'activation de la voie ERK 1/2 et JNK 1/2 (De Minicis and Brenner, 2007; Paik et al., 2011). De plus, la génération d'anion superoxyde ou d'eau oxygénée par un traitement à la menadione induit la migration cellulaire, même en l'absence de chimioattractants spécifiques (Novo et al., 2011).

L'hypoxie est un autre activateur de la migration des cellules étoilées, qui agit par deux mécanismes distincts. Après la mise en place de conditions d'hypoxie, les ERO générées par

la mitochondrie activent les voies ERK 1/2 et JNK 1/2, ce qui conduit à la migration des cellules. Une hypoxie prolongée induit une production et une sécrétion accrue de VEGF par les CEF, renforçant leur mobilité (Novo et al., 2012).

Il a été démontré que le microenvironnement de l'espace de Disse est un autre facteur clé dans la régulation du comportement migratoire des CEF. Une MEC composée de MMP-2 et de collagène de type I est capable d'induire la migration des CEF (Olaso et al., 2011; Yang et al., 2003). La fibronectine cellulaire contenant un domaine A d'épissage alternatif est exprimée lors de dommages hépatiques. La signalisation de ce variant de la fibronectine induit la formation de lamellipodes et la mobilité cellulaire (Olsen et al., 2012). Le récepteur de l'acide hyaluronique (CD44) est également augmenté lors de lésions hépatiques et de réparations, conduisant à la fois à l'activation et à la migration des CEF (Kikuchi et al., 2005).

### 2.2.7- L'immunorégulation

Ces dernières années, les CEF sont apparues comme des déterminants importants de l'immunorégulation hépatique. Ces cellules expriment en effet une large gamme de chimiokines telles CCL2 (Sprenger et al., 1999), CCL5 (Ohata et al., 1997), CXCL2, CCL21 (Bonacchi et al., 2003), CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12 et CX3CL3 impliquées dans le recrutement des neutrophiles, des macrophages/monocytes, des cellules NK/NKT, des cellules dendritiques, et des lymphocytes T, établissant ainsi leur rôle dans l'infiltration des cellules immunitaires. Beaucoup de ces chimiokines fonctionnent également indépendamment des cellules immunitaires et modulent la différenciation cellulaire, la survie, la prolifération et l'apoptose.

Les CEF contrôlent le recrutement de la fonction des cellules immunitaires par l'intermédiaire de trois mécanismes interdépendants (Su et al., 2012; Tacke and Weiskirchen, 2012) : (I) L'expression des molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1 (Holt et al., 2009). (II) La mise en place d'un gradient de chimiotactisme entre le sang périphérique et le foie, entraînant ainsi la migration de cellules immunitaires vers le foie ; et (III) la promotion ou l'inhibition de leur prolifération et de leur maturation dans le tissu.

Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR), et plus particulièrement le TLR4, contribuent significativement à la réponse des CEF. La stimulation des CEF avec le ligand du TLR4 augmente la signalisation du TGF- $\beta$  et la production de cytokines inflammatoires et chimioattractantes (IL-6, CCL2), conduisant à un phénotype encore plus

fibrotique (Guo et al., 2009b; Miura et al., 2012; Paik et al., 2003; Seki et al., 2007). De plus l'activation du TLR3 chez les CEF confère des activités anti-fibrotiques en stimulant la production d'IL-10 (Byun et al., 2013).

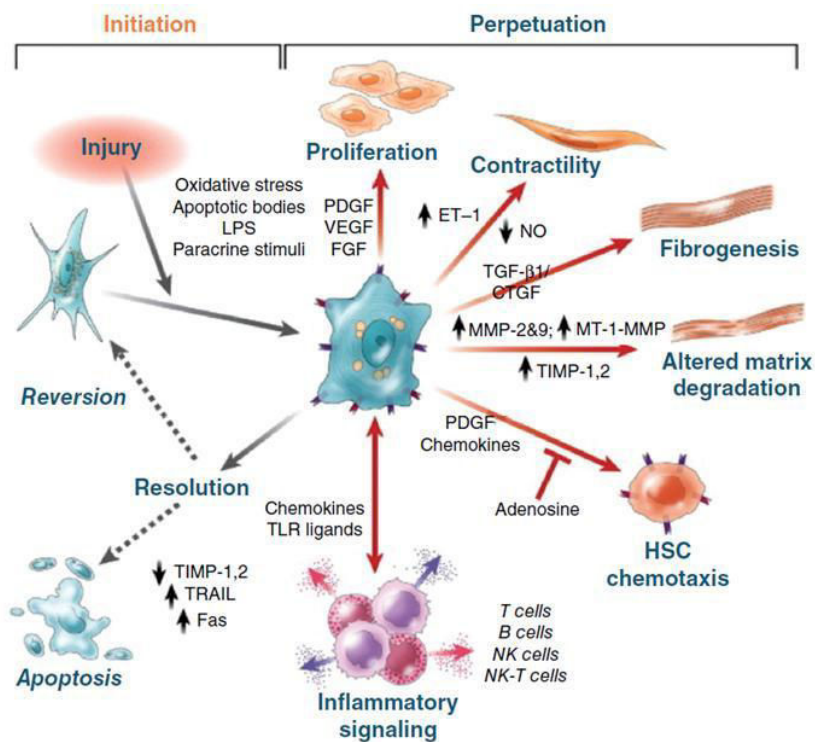
Pendant les phases avancées de fibrose, lorsque l'hypertension portale est survenue, une augmentation de la charge bactérienne déversée de l'intestin vers le foie est observée suite à l'augmentation de la perméabilité intestinale. La conséquence est une augmentation de l'exposition des CEF au LPS et leur activation *via* la voie du TLR4. Le traitement de souris par la rifaximine, un antibiotique, diminue la pression portale, la fibrose, et l'angiogénèse de façon dépendante du TLR4 (Zhu et al., 2012). La rifaximine inhibe spécifiquement la production de fibronectine par les CEF. Les cellules endothéliales sinusoidales du foie sont les cellules clé pour induire l'angiogénèse. La fibronectine des CEF permet d'induire la migration des cellules endothéliales sinusoidales du foie et la tubulogénèse, contribuant ainsi aux effets pathogènes du LPS (Zhu et al., 2012).

Les capacités des CEF s'étendent maintenant à leur rôle dans le développement des cellules dendritiques (Hsieh et al., 2010). Les cellules dendritiques exposées aux CEF ou à du surnageant de culture de CEF expriment un bas niveau de CD11c, de CD86, et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, ce qui provoque une fonction allostimulatoire inférieure comparée aux cellules dendritiques conventionnelles.

D'un point de vu complémentaire, la réponse inflammatoire peut également moduler l'activation des CEF et la fibrogénèse. Ainsi, une boucle d'autorégulation positive existe dans laquelle les cellules immunitaires et fibrogéniques se stimulent l'une et l'autre pour amplifier la fibrose. Par conséquent, les cellules pouvant réguler la progression ou la résolution de la fibrose incluent les macrophages (une cellules pivot avec des capacités à la fois pro- et anti-fibrotiques en sécrétant/régulant le TGF- $\beta$ 1, le PDGF, les MMP, et les TIMP) (Ramachandran and Iredale, 2012; Ramachandran et al., 2012), les cellules NK (activité anti-fibrotique en inhibant ou en éliminant les CEF activées) (Gao et al., 2009; Muhanna et al., 2011), les lymphocytes T (responsables de l'initiation/maintient de la réponse immune adaptative et pourraient induire des lésions hépatiques par l'intermédiaire du recrutement des cellules T CD4<sup>+</sup> exprimant le CCR1, grâce au CCL3/MIP1 $\alpha$ ) (Szabo et al., 2007), les lymphocytes B (promotion de la fibrose de manière indépendante des anticorps et des lymphocytes T) (Novobrantseva et al., 2005), ainsi que les cellules endothéliales (cellules présentatrices



d'antigènes pour les populations cellulaires T CD4+ et CD8+ ayant un activité de clairance des antigènes) (Knolle and Gerken, 2000).



**Figure 9 - Signalisations de l'activation des CEF et leur disparition lors des lésions hépatiques et de la résolution.** Les caractéristiques de l'activation des CEF peuvent être distinguées entre ceux qui stimulent l'initiation et ceux qui induisent la perpétuation. L'initiation est provoquée par des stimuli solubles qui incluent des signaux de stress oxydant (les intermédiaires réactifs de l'oxygène), les corps apoptotiques, le LPS, et des stimuli paracrines des cellules voisines telles les macrophages hépatiques (Kupffer), l'endothélium sinusoidal, et les hépatocytes. Elle est suivie par la phase de perpétuation, caractérisée par un nombre de changements phénotypiques spécifiques incluant la prolifération, la contractilité, la fibrogénèse, une dégradation altérée de la matrice, le chimiotactisme, et une signalisation inflammatoire. Lors de la résolution de la fibrose hépatique, il existe à la fois une mort cellulaire programmée (apoptose) et l'élimination des cellules fibrogéniques, ainsi qu'une réversion à un phénotype quiescent (FGF : *Fibroblast Growth Factor*, ET-1 : Endothéline-1, NK : *Natural Killer*, NO : *Nitric Oxide*, MT : *Membrane Type*) (Puche et al., 2013).

## C- L'inflammasome

Comme décrit précédemment, les macrophages participent activement aux mécanismes de la réponse immunitaire innée. La détection par ces cellules de signaux exogènes d'origine microbienne, les PAMP (*Pathogen-associated molecular pattern*) ou d'origine particulaire, chimiques ou endogènes, les DAMP (*Damage associated molecular patterns*), va conduire à l'initiation de la cascade inflammatoire et à l'activation d'une réponse immunitaire. La reconnaissance de ces motifs est assurée par une famille de récepteurs, les PRR. De manière générale, les différents sous type de monocytes et de macrophages peuvent être caractérisés par le répertoire d'expression des PRR reconnaissant les différents motifs. Les PRR regroupent ainsi plusieurs familles de récepteurs dont la famille des NLR (*Nod-like receptor*) dans laquelle s'inscrit le sous-groupe des inflammasomes.

### 1- Découverte de l'inflammasome

Un lien entre une forme mutée d'un nouveau gène codant pour une protéine *Pyrin-like* et le syndrome de Muckle-Wells, une maladie auto-immune rare caractérisée par des épisodes récurrents de fièvre et d'éruptions cutanées associés à des manifestations oculaires et articulaires (Neven et al., 2008), est établi pour la première fois en 2001 par Hoffmann et ses collègues (Hoffman et al., 2001). En 2002, Martinon et son équipe (Martinon et al., 2002) décrivent le complexe de haut poids moléculaire inductible composé par la protéine NLRP3, une protéine adaptatrice (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain* « ASC »), et une caspase, qu'ils ont appelé « inflammasome ». Deux années plus tard, Agostini et al. (Agostini et al., 2004) démontrent que la production constitutive d'IL-1 $\beta$  active observée dans le syndrome de Muckle-Wells a pour origine moléculaire un désordre lié au complexe inflammasome NLRP3. En 2004, Mariathasan et al. (Mariathasan et al., 2004) apportent la preuve de la nécessité du recrutement d'ASC pour assurer l'activité du complexe inflammasome, puisque des macrophages isolés de souris *knockout* ASC et stimulées à l'ATP sont incapables de produire de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 sous forme mature.

### 2- Les PRR

Des PRR ont été identifiés au niveau des macrophages, des monocytes, des cellules dendritiques, des neutrophiles, des cellules épithéliales et des cellules du système immunitaire adaptatif. Ils regroupent plusieurs familles de récepteurs dont les TLR, les CLR (*C-type lectin receptors*), les récepteurs éboueurs ou *scavengers* mais également les RLR (*Rig-like*

*receptors*) et les NLR (Areschoug and Gordon, 2008; Rietdijk et al., 2008). Les PRR peuvent être membranaires, de compartiment intracellulaire ou encore intracytoplasmique. C'est par ces différences de localisations que les PRR vont présenter des fonctions particulières avec des spécificités de reconnaissance propres. Par exemple, les récepteurs membranaires de surface interviennent plutôt dans la phagocytose et/ou l'activation de voies de signalisation qui pourront orienter la réaction des monocytes/macrophages. Par contre, les récepteurs intracellulaires interviennent dans la reconnaissance d'éléments libérés à l'intérieur de la cellule ou ayant pénétrés à l'intérieur de la cellule par des mécanismes indépendants de la phagocytose. Enfin, certains d'entre eux sont des récepteurs solubles notamment les collectines, les ficolines et les pentraxines, qui lient les microbes et servent principalement de ponts moléculaires entre les microorganismes et les facteurs du complément ou les récepteurs de phagocytose afin de faciliter leur destruction. Les PRR transmembranaires sont les TLR et les CLR, tandis que les PRR cytosoliques sont les RLR et les NLR.

### 2.1- Les récepteurs *Toll-like* ou TLR

Les TLR regroupent plus de 12 protéines différentes et sont impliqués dans la reconnaissance de PAMP et de DAMP de différentes natures physiologiques, comme les peptides, les lipopeptides, les glycopeptides et les acides nucléiques. Ils sont situés à la surface des cellules et dans des compartiments endosomaux. L'un des mieux caractérisés est le TLR4 capable de reconnaître le LPS ainsi que l'alarmine *high-mobility group box 1* (HMGB1) (Bianchi, 2007). Le TLR2 va reconnaître des lipopeptides, des lipoarabinomannanes, des lipomannanes, les acides téichoïques, les glycoprotéines, ainsi que la molécule d'alarme endogène et l'acide urique (Gil and Gozalbo, 2006). Le TLR3 quand à lui reconnaît les ARNs doubles brins. Après leur engagement, les TLR initient la voie de signalisation par leur domaine *Toll/IL-1 receptor* (TIR) intracytoplasmique. A l'exception du TLR3, tous les TLR recrutent *via* les domaines TIR des molécules adaptatrices nécessaires à la signalisation : Myd88, *IL-1 receptor-associated kinase* (IRAK) aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et des *mitogen-activated protein* (MAP) kinases (Krishnan et al., 2007). La réponse inflammatoire déclenchée par les TLR dépend de ceux engagés et des molécules adaptatrices qui sont recrutées.

## 2.2- Les récepteurs Lectine de type-C ou CLR

Les CLR représentent une superfamille de récepteurs possédant un ou plusieurs domaines lectine de type-C subdivisés en plusieurs sous-groupes. A l'origine leur activité a été décrite comme dépendante du calcium, cependant de nombreux CLR ont été par la suite découverts indépendants au calcium pour fonctionner. On les retrouve dans le système immunitaire, avec des fonctions incluant l'adhésion cellulaire, le renouvellement des glycoprotéines ou la reconnaissance des pathogènes basée soit sur la reconnaissance des glycanes endogènes ou de la liaison de ces glycanes à des microorganismes. Les domaines cytoplasmiques de deux récepteurs, la dectine-1 pour les macrophages et les cellules dendritiques, et la prolectine pour les lymphocytes B, contiennent des motifs de signalisation qui permettent une activation directe de la kinase Syk. Les réponses stimulées par la signalisation de la dectine-1 incluent la phagocytose et la production de cytokines inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (Marakalala et al., 2013). La dectine-1 apparaît pour être très importante à l'immunité antifongique, et tout particulièrement contre *Candida* à la fois chez l'humain et la souris (Plato et al., 2013).

## 2.3- Les récepteurs éboueurs ou *scavengers*

Ils représentent un ensemble de récepteurs de surface qui reconnaissent des composés anioniques, des *low density lipoproteins* modifiées par oxydation ou bien certains pathogènes. Ils sont principalement exprimés par les macrophages et certaines cellules endothéliales. Ils sont surtout très importants dans le mécanisme de phagocytose et d'élimination des corps apoptotiques. Trois classes de récepteurs sont répertoriés : A, B et C selon leurs caractéristiques de structure. Par exemple, le récepteur CD36 de classe B contribue à l'homéostasie des lipoprotéines et à la clairance des corps apoptotiques. Il est également capable d'identifier les érythrocytes parasités par le *Plasmodium falciparum* et participe ainsi à leur élimination de l'organisme.

## 2.4- Les *Rig-like receptors* ou RLR

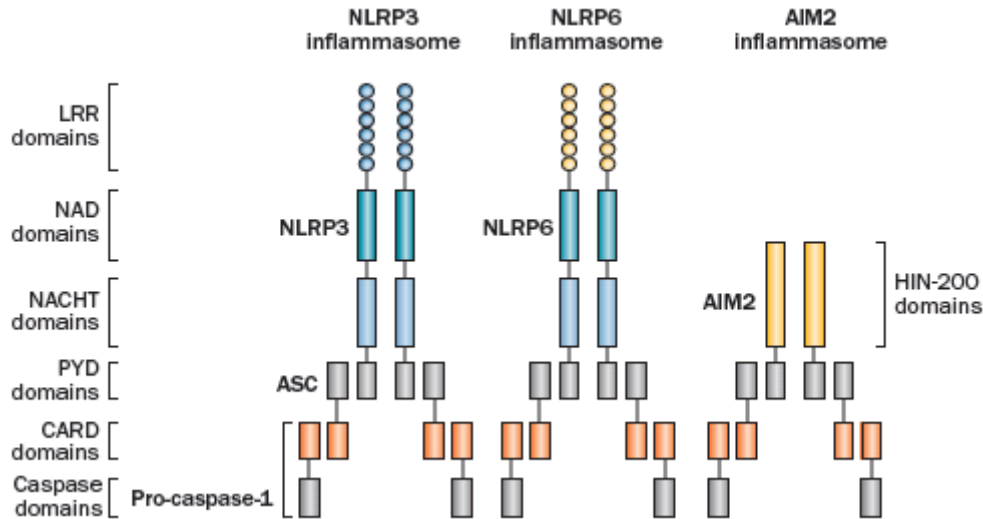
Cette famille de récepteurs comprend comme membre RIG-1, MDA5 et LGP2. Elle a pour fonction la reconnaissance des acides nucléiques viraux et bactériens cytoplasmiques. RIG-1 et MDA5 ont la capacité d'induire une réponse cellulaire via leurs domaines de recrutement de la caspase (domaine CARD) conduisant à l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et à la production de cytokines inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IFN de type I. Les autres

membres de RLR ne possèdent pas de domaine CARD mais sont associés à ces récepteurs afin de favoriser leur réponse.

### 2.5- Les *Nod-like receptors* ou NLR

Les protéines NLR sont une famille de récepteurs situés dans le cytosol, qui détectent des motifs moléculaires de pathogènes, les PAMP, ainsi que des ligands intracellulaires. Les protéines NLR contiennent des motifs protéiques nommés "death fold" (DF), qui peuvent être soit un domaine CARD, soit un domaine pyrine (PY ou PYD). Les DF forment des multimères avec d'autres membres de la même famille. Le domaine CARD est un domaine de recrutement de protéases nommées « caspases » et permet leur régulation. Les NLR les mieux caractérisés sont NOD1, NOD2, *NLR family containing a CARD domain 4* (NLRC4) et *NLR family pyrin domain containing 3* (NLRP3) (Rietdijk et al., 2008).

Les NLR sont composés de trois domaines (**Figure 10**). En C-terminal se situe un domaine de liaison aux pathogènes et d'auto-inhibition : *leucine rich repeats* (LRR). Ce domaine présente une répétition de structures communes de 20 à 30 acides aminés avec une séquence caractéristique riche en leucine, qui est un acide aminé hydrophobe. Au centre se trouve un domaine NACHT (NAIP - *NLR family-apoptosis inhibitory protein* - CIITA - *class II transactivator* - HEP-E, TPI-1) également appelé NOD ou *nucleotide binding domain* (NBD), responsable de l'oligomérisation après activation en présence d'ATP. Ce domaine présente des similarités avec le domaine central NB-ARC de l'apoptosome *apoptotic protease-activating factor 1*. En N-terminal, les domaines sont variables en fonction de la sous-famille à laquelle ils appartiennent et sont responsables de la fonction effectrice des NLR. Il est à noter que la liaison entre le domaine LRR et le domaine central est indispensable pour la fonction de l'inflammasome (Bauernfeind et al., 2011 ; Schroder and Tschopp, 2010).



**Figure 10 - Organisation des domaines des protéines de l'inflammasome.** Les composants essentiels identifiés appartiennent à deux familles, NLR et PYHIN. Le membre de la famille PYHIN « AIM2 » est caractérisé par un domaine HIN200, impliqué dans la liaison du ligand, et un domaine PYD (Szabo and Petrasek, 2015).

Les NLR, grâce au domaine central NOD, appartiennent également à un sous-groupe de protéines capables de lier et d'hydrolyser l'ATP, les protéines *signal transduction ATPases with numerous domains* (STAND). Ces protéines sont des membres de la super-famille des ATPases. Les protéines STAND sont régulées *via* la liaison aux nucléotides : la forme latente est liée à l'adénosine diphosphate (ADP) et la forme activée est liée à l'ATP. La liaison aux PAMP ou DAMP provoque un changement conformationnel, qui permet l'échange entre l'ADP et l'ATP dans le domaine NOD. L'hydrolyse de l'ATP peut permuter la protéine STAND au stade latent. Chez les plantes, les protéines NLR s'homodimérisent alors que chez les mammifères, elles recrutent d'autres protéines pour former des plateformes protéiques multimériques. L'oligomérisation se produit via l'association des domaines N-terminaux (CARD ou PYD chez les mammifères) (Stehlik et al., 2003). Ce mécanisme semble crucial notamment pour le contrôle de l'activité des NLR participant aux inflammasomes. Les NLR suivent un cycle lent alternant entre les états activés et inactivés, ce qui permet au système de répondre rapidement aux stimuli (Di Virgilio, 2013; Latz, 2010; Naik and Dixit, 2010).

### 3- Transduction, activation et régulation de la signalisation de l'inflammasome

L'inflammasome est donc un complexe intracytoplasmique s'oligomérisant, et contenant au moins un NLR et une caspase-1 à activer (Martinon et al., 2002). Ce complexe nécessite

parfois la protéine de liaison ASC qui assure la jonction du NLR avec la caspase-1 effectrice. Les NLR contenant un domaine PYRIN nécessite ASC pour pouvoir s'associer à la caspase-1 et conduire à l'activation de cette protéase afin qu'elle puisse cliver l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 sous leur forme mature (Gross et al., 2011). La caspase-1 est une cystéine protéase intracellulaire maintenue dans la cellule sous la forme d'un zymogène inactif de 45 kDa (Ayala et al., 1994; Thornberry et al., 1992; Wewers et al., 1997). Lorsqu'elle est activée, elle subit un clivage protéolytique afin de produire des sous-unités actives de 10 et 20 kDa. La production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 nécessite une étape de « *priming* », apporté par la reconnaissance de la cellule de DAMP ou de PAMP, ce qui induit l'expression des NLR ainsi que de la pro-IL-1 $\beta$  et de la pro-IL-18. Le second signal consiste en l'assemblage de l'inflammasome, qui est amorcé par des produits qui s'accumulent lors de la rencontre avec des microorganismes ou bien des toxines, et qui inclus un efflux potassique, la signalisation calcique, le signal de danger (par l'ATP), une rupture de l'endosome (par la cathepsine B), l'activation de la protéine kinase par de l'ARN (PKR), la signalisation de la GMP ou AMP cyclique, ou encore le stress oxydatif (par les espèces réactives de l'oxygène) (Abdul-Sater et al., 2013; Jin and Flavell, 2010; Lee et al., 2012; Lu et al., 2012; Martinon, 2010).

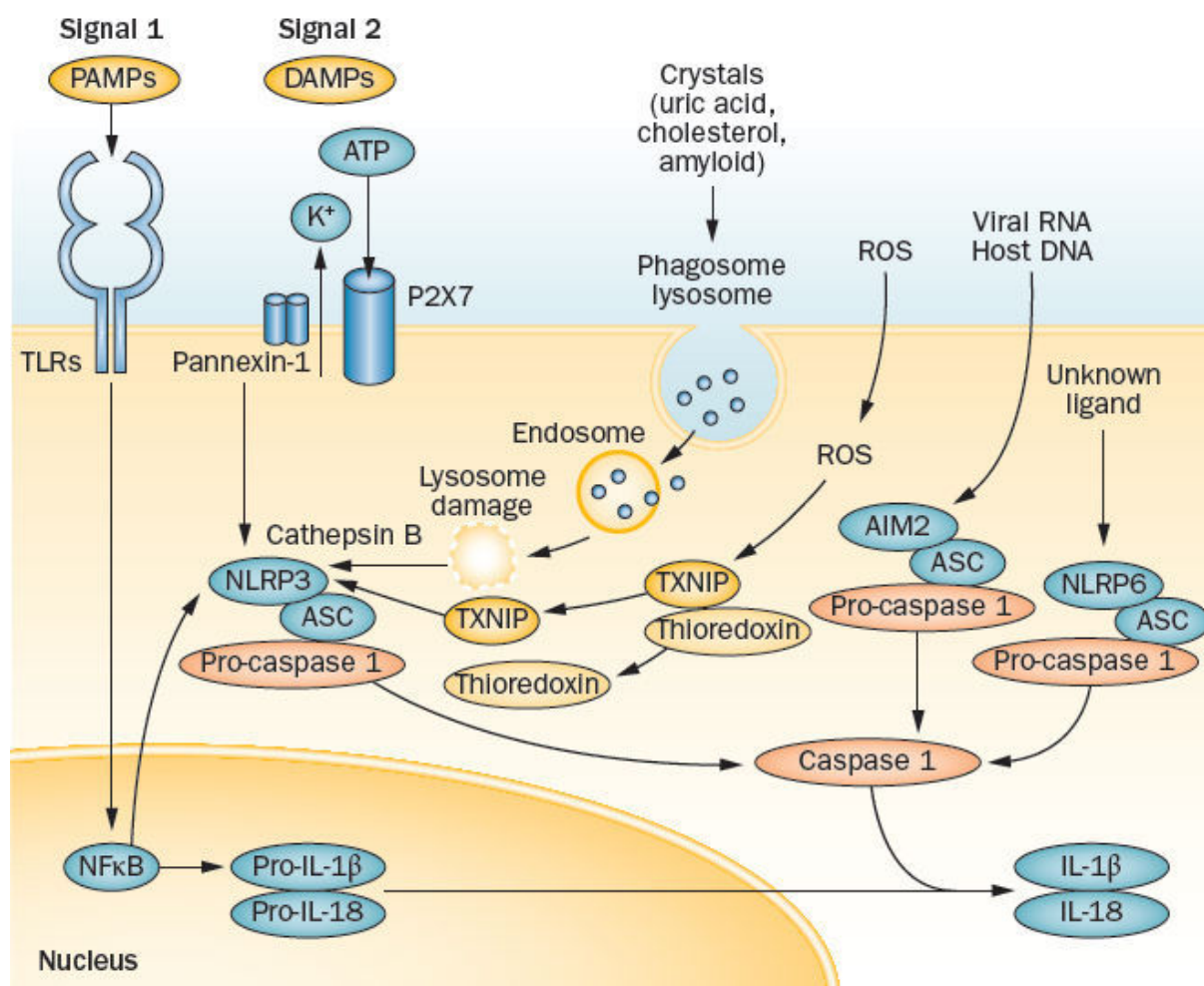
Plusieurs inflammasomes ont pu être décrits, induit par des infections virales, des composants dérivés des microbes, ou bien l'exposition à des substances toxiques (**Tableau 2**).

**Tableau 2 - Sélection de déclencheurs de l'activation des inflammasomes.**

Inflammasome	Activé par	Source	Référence
NLRP1	La toxine létale de <i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	(Boyden and Dietrich, 2006)
NLRP3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ATP</li> <li>- Cristaux de MSU</li> <li>- ERO</li> <li>- Pathogènes entiers</li> <li>- Virus</li> <li>- Toxines bactériennes</li> <li>- Irritants environnementaux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cellules lésées</li> <li>- Cellules lésées</li> <li>- Stress cellulaire</li> <li>- <i>Candida albicans</i>, <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li> <li>- Virus de Sendai, Adenovirus, Virus de l'Influenza</li> <li>- <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>- Silice, Abestos</li> </ul>	<p>(Mariathasan et al., 2006)</p> <p>(Martinon et al., 2006)</p> <p>(Zhou et al., 2011)</p> <p>(Schroder and Tschopp, 2010)</p> <p>(Kanneganti et al., 2007)</p> <p>(Mariathasan et al., 2006)</p> <p>(Dostert et al., 2008; Hornung et al., 2008)</p>
NLRC4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Flagelline</li> <li>- Systèmes de sécrétion de type II/IV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Salmonella typhimurium</i></li> <li>- <i>Shigella flexneri</i>, <i>Legionella pneumophila</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> </ul>	<p>(Franchi et al., 2006)</p> <p>(Case et al., 2009; Sutterwala et al., 2007; Suzuki et al., 2007)</p>
AIM2	ADN double brin	<i>Francisella tularensis</i> , Cytomegalovirus, <i>Listeria monocytogenes</i>	(Rathinam et al., 2010)



Les plus connus des inflammasomes incluent NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP12, AIM2 (qui présente un senseur différent de la famille PYHIN « *pyrin and HIN domain-containing family* »), NLRC4, et RIG-I (Hornung et al., 2009; Martinon et al., 2009; Masters et al., 2010; Poeck and Ruland, 2012). Même si historiquement, c'est Nalp1 (Nlrp1) qui fut découvert en premier, il s'avère qu'à ce jour c'est l'inflammasome Nalp3 (Nlrp3 ou cryopyrine) qui est au centre de la majorité des études et est certainement le mieux caractérisé de tous les inflammasomes. Deux raisons principales expliquent ce phénomène. Tout d'abord, les mutations du gène de CIAS (qui code pour la protéine Nlrp3) sont associées à de nombreux désordres inflammatoires. La deuxième raison est à ce jour que Nlrp3 possède de nombreux signaux activateurs ayant beaucoup d'implications physio-pathologiques. Parmi ces nombreux stimuli activateur, on retrouve les infections bactériennes et virales, des toxines provenant de microbes comme la nigericine, des molécules de stress provenant de lésions telles l'ATP *via* la fixation au récepteur purinergique P2X7 et l'engagement du canal pannexine 1 permettant de créer un pore dans la membrane plasmique et laisser passer les PAMP pour interagir physiquement avec Nlrp3, un niveau élevé de glucose, les cristaux d'acide urique, et d'autres microparticules contaminantes de l'environnement comme la silice ou l'abestos (Martinon et al., 2006; Palomäki et al., 2011; Piccini et al., 2008) (**Figure 11**). Les ARN viraux comme ceux du virus de l'influenza ou bien de l'hépatite C ont été identifiés comme activateur de l'inflammasome NLRP3. L'action de l'inflammasome NLRP3 peut être supprimé par l'IFN de type I, TRIM20, le miRNA-232, et l'oxyde nitrique (Chen and Sun, 2013; Piccini et al., 2008). Pour les autres inflammasomes, NLRP1b est activé par la toxine létale anthraxique (Levinsohn et al., 2012), NLRC4 par des infections bactériennes comme avec *Salmonella typhimurium* (Zhao et al., 2011), NLRP12 en réponse à *Yersinia pestis* (Vladimer et al., 2012) et AIM2 par des ADN double brin viraux ou bactériens (Hornung et al., 2009).



**Figure 11 - Mécanismes d'action de l'inflammasome.** L'activation de l'inflammasome NLRP3 se déroule en deux étapes. Dans la première étape, un PAMP se lie à son TLR, ce qui augmente l'expression de NLRP3, ainsi que la production de pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18. Un second signal est nécessaire pour activer la caspase-1, qui va cliver les précurseurs en forme mature d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18. L'activation de NLRP3 survient par trois mécanismes distincts : (1) la liaison de l'ATP au récepteur P2X7, ce qui ouvre un canal cationique et un pore large *via* la pannexine-1, entraînant un efflux potassique ; (2) l'endocytose de particules stériles, induisant une rupture du lysosome et une déstabilisation de la membrane, activant ainsi la cathepsine B et diminuant le pH intracellulaire ; (3) les ERO, générées lors du stress ou bien de la mort cellulaire, initient un détachement de la *thioredoxin-interacting protein* (TXNIP) à la thioredoxine, lui permettant d'aller activer NLRP3. D'autres inflammasomes comme AIM2 sont activés par l'ADN de l'hôte provenant de cellules mortes (comme les hépatocytes dans le foie) ou bien des ARN viraux. Il existe des inflammasomes comme NLRP6 dont les ligands ne sont pas encore identifiés (Szabo and Petrasek, 2015).



## **Chapitre III : Rôle du microenvironnement inflammatoire dans le développement de la fibrose hépatique**

### **A- Implication des macrophages dans le développement de la fibrose hépatique**

#### 1- Rôle des macrophages dans l'homéostasie du foie

Le rôle des cellules de Kupffer dans l'activation des CEF et l'activité fibrogénique dépendante de leur activation *via* des médiateurs incluant des radicaux libres, du TNF- $\alpha$ , et du TGF- $\beta$  est bien documenté (Friedman, 2008a). Chez l'homme, l'infiltration de phagocytes mononucléaires dans le foie est corrélée à la sévérité de la cirrhose alcoolique (Luna-Casado et al., 1997). De plus, les macrophages hépatiques sont impliqués dans l'hépatotoxicité induite par un surdosage de paracétamol, par l'intermédiaire de la production de cytokines pro-inflammatoires et d'autres médiateurs comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et le monoxyde d'azote (Laskin and Pendino, 1995). Les cellules de Kupffer sont capables d'induire une réponse inflammatoire, et leur inhibition ou leur élimination améliore les dommages hépatiques dans de nombreux modèles expérimentaux. Ainsi, le chlorure de gadolinium (GdCl<sub>3</sub>) qui induit une déplétion en cellules de Kupffer, a été utilisé dans plusieurs expérimentations impliquant des lésions hépatiques. Chez des rats traités au CCl<sub>4</sub> pendant 9 semaines et traités au GdCl<sub>3</sub>, une diminution de la fibrose hépatique avec une expression réduite du TGF- $\beta$  et de l' $\alpha$ -SMA est observée (Rivera et al., 2001). Ce résultat est également obtenu dans un modèle de lésions hépatiques induites par l'éthanol où l'utilisation de GdCl<sub>3</sub> diminuait les marqueurs de dommages hépatiques (Adachi et al., 1994). Dans un modèle de stéatohépatite induite chez la souris par un régime MCD, la déplétion des macrophages hépatiques par des injections intraveineuses de liposomes enrichis en clodronate permet d'atténuer les manifestations histologiques de stéatohépatite (Rivera et al., 2007). Au cours du développement de l'inflammation le *pool* de macrophages hépatiques augmente. Pendant la phase précoce, les macrophages résidents du foie sécrètent des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , le CCL2 et le CCL5. Cela conduit à des activations paracrines de voies de signalisation protectrices ou apoptotiques des hépatocytes, ainsi qu'au recrutement de cellules immunitaires qui vont amplifier les lésions hépatiques (Luedde and Schwabe, 2011). De plus, les stimuli inflammatoires ne sont pas les seuls signaux à pouvoir contribuer à moduler l'activation des macrophages hépatiques. En effet, des signaux métaboliques induits par un excès de lipides ou des dérivés du cholestérol dans la stéatose ou la NASH modulent la réponse des cellules de Kupffer en leur conférant un phénotype pro-inflammatoire (Bieghs et

al., 2013; Leroux et al., 2012). Le rôle homéostatique des macrophages est de phagocyter et d'éliminer les cellules apoptotiques dans les tissus. Lorsqu'ils rencontrent des organismes étrangers ou des débris nécrotiques à la suite de lésions, ils sont activés par des signaux de dangers et des PAMP. Ces macrophages produisent alors des médiateurs tels que des ERO ou du nitrogène et des protéases qui vont aider à la destruction des pathogènes envahisseurs, ce qui permet de restituer l'homéostasie tissulaire et sa réparation. Cependant, ils libèrent également une grande variété de cytokines et de chimiokines comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6, et le CCL2 qui vont contribuer à promouvoir la réponse inflammatoire et antimicrobienne par la suite. En conséquence, cette réponse inflammatoire exacerbe les lésions tissulaires et dans certains cas peut conduire à une fibrogénèse si la réponse n'est pas contrôlée adéquatement, comme il a pu l'être démontré par la déplétion sélective des macrophages du foie à différentes étapes de la réponse réparatrice. De plus, les macrophages hépatiques peuvent exprimer plusieurs MMP matricielles, incluant la MMP-9, la MMP-12, et la MMP-13, qui sont impliquées dans la dégradation de la matrice, et donc favorisent la résolution des blessures hépatiques et de la fibrose (Fallowfield et al., 2007; Pellicoro et al., 2012).

Ainsi récemment la recherche s'est focalisée sur l'élucidation des mécanismes qui contrent l'inflammation et préviennent du développement de la fibrose. Bien que la plupart des réponses de guérisons tissulaires face à une agression se termine une fois que l'agent responsable de cette agression disparaît, dans la plupart des maladies fibrotiques chroniques, l'agent est soit inconnu, soit ne peut pas être facilement éliminé. Dans cette situation, il est impératif que la réponse des macrophages change d'un état pro-inflammatoire et fibrotique à un état anti-inflammatoire, suppresseur ou régulateur afin que les dommages collatéraux des tissus soient maintenus à un niveau minimal.

## 2- Hétérogénéité des macrophages et fibrose hépatique

Les macrophages hépatiques tiennent une position centrale dans la pathogénèse des atteintes chroniques du foie et ont été proposés comme cibles potentielles pour combattre la fibrose (Schuppan and Kim, 2013). Par exemple, des tests chez la souris ont permis d'évaluer le traitement de la cirrhose hépatique par administration de cellules de la moelle osseuse d'un donneur sain. Ces cellules précurseurs de la lignée des monocytes-macrophages induisent une augmentation précoce des chimiokines permettant un recrutement au foie de macrophages endogènes et de neutrophiles. Ces cellules produisent de la MMP-13 et MMP-9 dans le tissu cicatriciel. Les cellules infiltrantes sont accompagnées par une augmentation du taux de

cytokine anti-inflammatoire IL-10. Après 4 semaines de traitement par les cellules de la moelle osseuse, il a été observé une diminution du nombre de myofibroblastes suivie d'un niveau réduit de fibrose (Thomas et al., 2011). L'ambivalence de l'activité des macrophages dans différents modèles expérimentaux de dommages hépatiques et l'identification de sous-populations présentant des fonctions opposées, ont entravé le développement de stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation de macrophages. En conformité avec le fait que la fibrose hépatique n'est pas un processus irréversible unidirectionnel, les macrophages hépatiques peuvent exercer une double-fonction dans un contexte de fibrose hépatique expérimentale en induisant ou en stoppant la déposition excessive de matrice extracellulaire (Duffield et al., 2005). De façon plus spécifique, lors de la phase de progression des lésions inflammatoires, la déplétion des macrophages permet de réduire la fibrose, tandis que la déplétion des macrophages au cours de la phase de guérison induit un échec de la réparation tissulaire avec la persistance des cellules et des composants matriciels de la réponse fibrotique. Les aspects importants caractérisant les différentes fonctions des macrophages, incluent l'origine des sous-populations de macrophages (dérivant des précurseurs des monocytes circulants ou les cellules de Kupffer résidentes), leur différenciation (souvent classifiée en M1 et M2), ainsi que leurs fonctions effectrices dans le contexte des pathologies du foie. L'hétérogénéité des macrophages est exprimée par une haute diversité de libérations de cytokines, de marqueurs de surface membranaires et de profils transcriptionnels. Afin de s'accommoder de ce large spectre des fonctions des macrophages et de leur phénotype, ces cellules ont été classées selon un phénotype M1 « pro-inflammatoires », ou un phénotype M2 « immunorégulateurs », bien que cette nomenclature dichotomique ne reflète pas complètement la biologie complexe des sous-types de macrophages (Murray and Wynn, 2011). En conséquence, les macrophages M2 sont dorénavant catégorisés en différents sous-types qui présentent des activités de réparation ou anti-inflammatoires mais peuvent également induire une inflammation dans certaines circonstances. Les macrophages M1 sont intimement liés aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th1, tandis que les macrophages M2 s'engagent avec les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2. Les macrophages M1 sont habituellement induits par l'IL-12, l'IFN- $\gamma$ , et le LPS en réponse à des incidents délétères, tandis que les macrophages M2 sont contrôlés par l'IL-4 et l'IL-13 (Mosser and Edwards, 2008). Les fonctions effectrices clés des macrophages M1 sont la clairance bactérienne, l'activité antivirale et la libération de cytokines pro-inflammatoires (telles que le TNF, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-12, des ERO), alors que les macrophages M2 soutiennent la défense contre les infections parasitaires, sont impliqués dans le remodelage du tissu et sécrètent des médiateurs immunomodulateurs (tels que l'IL-10, le

TGF- $\beta$ , l'IL-4, l'IL-13) (Murray and Wynn, 2011). Cependant, dans des conditions pathologiques telles qu'une péritonite bactérienne aigüe (M1) ou une infection chronique aux helminthes (M2), il est très difficile d'assigner des macrophages tissulaires à l'activation classique ou alternative. En effet, les macrophages du foie semblent exprimer simultanément des marqueurs d'activation M1 et M2 (Ramachandran et al., 2012), indiquant que ce concept dichotomique ne peut pas être entièrement appliqué aux pathologies hépatiques. Les modèles expérimentaux de dommages hépatiques chez le rongeur ont révélé que la fonction des sous-populations de macrophages hépatiques dans le contexte de maladies du foie dépend largement de leur origine (Zimmermann et al., 2012).

Il a également été montré que les macrophages font preuve d'une grande plasticité, très dynamique et peuvent changer de phénotype plusieurs fois, en fonction des stimuli de leur microenvironnement, leur *pattern* de sécrétion de cytokines et de chimiokines (Gratchev et al., 2006; Stout and Suttles, 2004; Stout et al., 2005). Par exemple, des macrophages primaires humains polarisés M1 peuvent être repolarisés par des facteurs sécrétés par leur propres homologues, les macrophages M2, et *vice versa*, *in vitro* (Ploeger et al., 2012).

### 3- Coopération entre les macrophages et les fibroblastes hépatiques

La localisation centrale des cellules de Kupffer dans les sinusoides leur permet des interactions proches avec les populations cellulaires non parenchymateuse du foie. D'une part, les macrophages hépatiques interagissent avec d'autres cellules immunitaires ; par exemple, ils sécrètent la chimiokine CXCL16 qui attire les cellules NKT, qui en retour induisent des signaux pro-inflammatoires dans les macrophages (Wehr et al., 2013). Il a été mis en évidence d'autre part, lors d'études *in vitro* et *in vivo* que les macrophages hépatiques pouvaient induire la différenciation des fibroblastes du foie en myofibroblastes (De Minicis et al., 2007; Pradere et al., 2013). Ainsi, les cellules de Kupffer activent les CEF par le biais de mécanismes paracrines, impliquant notamment des facteurs pro-fibrotiques et mitogènes, le TGF- $\beta$  et le PDGF (Pradere et al., 2013).

Il a été montré qu'*in vitro* les cellules de Kupffer et les myofibroblastes sont co-localisés dans les zones portales et dans les septa fibrotiques, suggérant une coopération entre ces deux cellules (Liu et al., 2010).

De nombreuses expérimentations ont montré que les cellules de Kupffer isolées de rats exposés à l'alcool ou au CCl<sub>4</sub> produisent des cytokines comme le PDGF et le TGF- $\beta$ 1 qui

stimulent la prolifération et la production de collagène par les CEF (Edwards et al., 1993; Gressner and Zerbe, 1987; Igotz and Massagué, 1986; Matsuoka and Tsukamoto, 1990; Shiratori et al., 1986; Zerbe and Gressner, 1988).

Une étude de co-culture entre une lignée humaine de fibroblastes pulmonaires WI-38 et des macrophages provenant de la différenciation de monocytes du sang périphérique a montré que l'activation alternative des macrophages (par l'IL-4) induit l'augmentation de l'index de prolifération et de la synthèse de collagène des cellules WI-38. A l'inverse, l'activation classique des macrophages par le LPS et l'IFN- $\gamma$  induit la diminution de la synthèse de collagène par ces cellules (Song et al., 2000). Plusieurs autres études ont pu montrer ce phénomène d'activité pro-fibrotique par les macrophages activés alternativement (Erwig et al., 1998; Fadok et al., 1998; Mantovani et al., 2002). Cependant, ces phénotypes ont été déterminés de façon prédominante dans des modèles de culture de tissus et ne reflètent donc pas la complexité de la fonction des macrophages *in vivo*. De plus, dans un tissu lésé, les macrophages apparaissent comme ayant des caractéristiques à la fois pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Mori et al., 2009; Wijesundera et al., 2014).

De façon intéressante, une étude a montré que les CEF elles-mêmes sont capables d'activer les macrophages et d'induire un phénotype pro-inflammatoire. En effet, après l'élimination spécifique des CEF entrant en prolifération après un traitement par du CCl<sub>4</sub> et du ganciclovir chez des souris soumises par la suite au LPS ou à l'ischémie-reperfusion, les cellules de Kupffer expriment des niveaux réduits de TNF- $\alpha$ , de CXCL1, et une expression augmentée ou inchangée d'IL-6 (Stewart et al., 2014). En sachant que les CEF elles-mêmes sont capables d'induire ces médiateurs, leur interaction avec les cellules de Kupffer devient encore plus intéressante et importante pour comprendre les mécanismes de l'inflammation et des lésions hépatiques. Cette étude renforce également l'hypothèse que la déplétion des CEF dans le foie conduit les cellules de Kupffer à un phénotype beaucoup moins inflammatoire (du M1 vers le M2). En général, les macrophages qui envahissent le tissu dans la phase inflammatoire de la cicatrisation adoptent un phénotype M1. Il a été montré dans un modèle de co-culture entre des macrophages polarisés M1 ou M2 et des fibroblastes de derme humain, que les facteurs sécrétés par les macrophages M1 influencent les propriétés de ces fibroblastes en seulement 24 heures (Ploeger et al., 2013). Ceci indique que les fibroblastes, sous l'influence de signaux paracrines de macrophages M1, contribuent à un environnement pro-inflammatoire en sécrétant des cytokines et des chimiokines (telles que le CCL2, le CCL7 et l'IL-6) lors de la phase inflammatoire de la cicatrisation, en accord avec les travaux de Holt et al (Holt et al.,



2010). Les macrophages activés exercent une double fonction dans l'orchestration du dépôt de la matrice et son remodelage. Lors de la phase d'initiation de l'activation des cellules étoilées du foie, il se crée un échange bidirectionnel entre les myofibroblastes et les macrophages résidents et nouvellement recrutés au foie lors de la phase inflammatoire (Wynn and Barron, 2010). En fonction du contexte et des signaux activateurs, les macrophages peuvent exercer des fonctions doubles sur les cellules étoilées et sur le dépôt de matrice extracellulaire. Il a été mis en évidence que la phagocytose de débris nécrotiques de cellules amorce la production de TGF- $\beta$  par les cellules de Kupffer et les macrophages recrutés. D'ailleurs, les macrophages, parmi les autres cellules hépatiques, sont la source prioritaire de TGF- $\beta$ 1 (Karlmark et al., 2009). De plus, l'IL-13, une cytokine induisant la polarisation des macrophages en M2 induit la production de TGF- $\beta$  ainsi que son activation par la MMP-9 (Lee et al., 2001). Les macrophages résidents ou recrutés et activés sont sources de facteurs de croissance, d'ostéopontine, de cytokines et de chimiokines qui permettent de recruter les monocytes de la circulation sanguine et d'affecter la fonction des fibroblastes et des cellules étoilées du foie. En particulier, des preuves génétiques d'un rôle dans les réponses fibroblastiques des récepteurs aux chimiokines, C-C chemokine receptor (CCR)2, CCR1, and CCR5 ont été apportées. D'ailleurs, il est à noter que les macrophages CCR2<sup>high</sup>Ly6C<sup>low</sup> provenant de monocytes ont été identifiés comme présentant un phénotype M2 dans différents cas pathologiques associés à des fibroses (Beschinn et al., 2013). Ces cellules sont ainsi pensées pour interagir avec les CEF *via* la sécrétion de TGF- $\beta$  pour induire la fibrose.

Des modèles murins ont révélé que lors de blessures hépatiques, des monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> s'accumulent dans le foie, dépendamment de l'interaction chimiokine-récepteur CCL2/CCR2 ou CCL1/CCR8. L'une des sources majoritaires de CCL2 sont les CEF, qui sont activés par des ligands du TLR4 et ainsi guident le recrutement des monocytes (Seki et al., 2007).

## **B- L'inflammasome dans les maladies du foie**

### 1- Maladies alcooliques du foie

L'alcool possède une hépatotoxicité directe et son mode d'ingestion va influencer la réponse de l'organe. Ainsi, une consommation massive d'alcool sur une courte période provoque une stéatose hépatique alors qu'une consommation plus chronique d'alcool conduit à une stéatohépatite, une fibrose, et une cirrhose. Les stades avancés telles la cirrhose ou les hépatites alcooliques sévères, sont considérés comme irréversibles, avec des conséquences létales pour les patients en raison de la défaillance fonctionnelle du foie (O'Shea et al., 2010).

L'activation de l'immunité innée et de l'inflammation sont des contributeurs majeurs à la progression de la maladie alcoolique du foie (Mandrekar and Szabo, 2009). Les patients souffrant d'une hépatite alcoolique aiguë présentent des niveaux sériques élevés en TNF, en IL-1 et en IL-8, ainsi qu'une surexpression de la caspase-1 et du NLRP3 dans le foie, une neutrophilie, et une activation des monocytes et des macrophages (McClain et al., 1986; O'Shea et al., 2010; Peng et al., 2014). Les patients avec les formes les plus sévères d'hépatites alcooliques présentent des taux sériques d'IL-1 $\beta$  élevés en comparaison avec des individus sains (McClain et al., 1986). L'inflammation joue un rôle majeur dans la progression de la maladie alcoolique du foie, et l'augmentation de l'IL-1 $\beta$  et de la neutrophilie témoigne d'une activation de l'inflammasome (Gao and Bataller, 2011). De même, la présence de corps de Mallory-Denk dans la pathologie du foie, une des caractéristiques de l'hépatite alcoolique, est corrélée à une augmentation de l'expression des composants de l'inflammasome, NLRP3, ASC, caspase-1, et de l'IL-1 $\beta$  dans l'hépatite alcoolique humaine aiguë (Peng et al., 2014). Le rôle clé de l'activation de l'inflammasome dans la progression de la maladie alcoolique du foie a été confirmé par l'expérimentation animale. L'administration chronique d'éthanol à des souris *wild-type* induit une stéatose, des dommages hépatiques, et une augmentation de l'expression dans le foie d'IL-1 $\beta$ , de pro-caspase-1, d'ASC et de NLRP3 (Petrasek et al., 2012). De la même façon, une exposition de souris à l'éthanol augmente l'activité de la caspase-1 dans le foie, témoignant de l'activation de l'inflammasome (Petrasek et al., 2012). Des souris *knockout* pour l'*il1r1* et déficientes en caspase-1 ou en ASC étaient protégées de l'activation de l'inflammasome et de l'IL-1 $\beta$ , et exhibaient des niveaux de dommages et de stéatose réduits après administration d'éthanol (Petrasek et al., 2012). L'absence d'activation de l'inflammasome empêche également l'accumulation de cellules inflammatoires dans le foie, induisant une réduction des cytokines inflammatoires, telles que le TNF, l'IL-6 et le CCL2. Des injections journalières d'un antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra), l'anakinra, réduisent l'inflammation induite par l'alcool associée à une diminution, dépendante de la concentration, de la stéatose et des dommages hépatiques (Petrasek et al., 2012). De plus, lorsque les souris sont traitées avec l'anakinra 2 semaines après l'administration d'éthanol, la stéatose et les dommages hépatiques sont également atténués. Des résultats similaires sont obtenus lorsqu'il est administré durant la phase de récupération d'une exposition aiguë à chronique à l'éthanol (Petrasek et al., 2012). L'inhibition de la signalisation de l'IL-1 $\beta$  bloque la progression de la maladie alcoolique du foie et accélère la récupération du foie après un sevrage de l'éthanol. L'analyse des cellules en culture primaire extraites de foie de souris a démontré que l'expression de la caspase-1, d'ASC et de NLRP3 est environ 20 fois plus

importante dans les cellules immunes du foie que dans les hépatocytes. Dans des expériences plus approfondies, l'administration d'éthanol à des souris *wild-type* induit le clivage de la caspase-1 dans les cellules immunes mais pas dans les hépatocytes (Petrasek et al., 2012). Des expériences de déplétion ciblée de la caspase-1 dans certaines cellules chez la souris, ont permis d'identifier les cellules de Kupffer comme principale cause de la progression de la maladie alcoolique du foie en lien avec l'activation de l'inflammasome (Petrasek et al., 2012). Dans d'autres études, NLRP3 a été retrouvé indispensable à l'activation de la caspase-1 induit par l'éthanol dans les cellules de Kupffer *in vitro* (Shulga and Pastorino, 2014). Dans une étude publiée en 2014, les auteurs ont suggéré que l'inflammasome NLRP3 était impliqué dans la mort des hépatocytes induit par l'éthanol (Xiao et al., 2014). Cependant, leur conclusion était basée sur l'exposition d'une lignée d'hépatocytes avec une forte dose d'éthanol (1000 mM), 10 fois supérieure aux concentrations utilisées dans les autres études, et donc limitant les interprétations de cette étude (Clemens, 2006; Xiao et al., 2014). En résumé, le rôle pathogénique de l'inflammasome dans la maladie alcoolique du foie est conduit par son activation dans les cellules de Kupffer.

Les mécanismes activateurs de l'inflammasome dans la maladie alcoolique du foie n'ont pas encore été complètement élucidés. Le LPS provenant de l'intestin, dont la signalisation s'opère *via* le TLR4 (Gao et al., 2011; Szabo, 2015), est probablement le premier signal à induire l'expression de l'IL-1 $\beta$  (Inokuchi et al., 2011; Petrasek et al., 2012). Des expérimentations utilisant des souris chimériques exprimant une déficience de la caspase-1 spécifiques à des cellules ont permis de démontrer que l'activation de l'inflammasome et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  dans la maladie alcoolique du foie est spécifique aux cellules de Kupffer (Petrasek et al., 2012). La nature du deuxième signal qui permet l'assemblage du complexe protéique et donc la libération d'IL-1 $\beta$  mature est moins facile à identifier. Cependant, le dysfonctionnement mitochondrial induit par l'éthanol est associé à des modifications du métabolisme de l'acide urique et de l'ATP, deux signaux connus pour être activateurs de l'inflammasome NLRP3, augmentant ainsi la probabilité qu'ils pourraient être la source de ce deuxième signal (Hoek et al., 2002; Lieber et al., 1962; Petrasek et al., 2015; Stibůrková et al., 2014). En effet, des individus exposés à de l'éthanol ont des taux d'acide urique plus élevés dans le sérum (Lieber et al., 1962), et le traitement de rats exposés à l'éthanol avec de l'allopurinol, un inhibiteur de la synthèse d'acide urique, améliore l'inflammation du foie, la stéatose et les dommages tissulaires (Kono et al., 2000). De plus, des souris avec une déficience génétique pour le récepteur à l'ATP P2X7 n'expriment pas d'activation de l'inflammasome dans le foie en

réponse à l'éthanol (Petrasek et al., 2015). Ainsi, l'acide urique et l'ATP représente probablement le second signal d'activation de l'inflammasome dans la maladie alcoolique du foie, cependant, la possibilité que d'autres molécules puissent être impliquées dans ce processus ne peut pas être exclue définitivement. Pour exemple, l'HMGB1, une alarmine sécrétée en grande partie par les hépatocytes endommagés et reconnue par les cellules immunes, est un signal pro-inflammatoire fort dans la maladie alcoolique du foie et pourrait activer l'inflammasome (Ge et al., 2014). HMGB1 est reconnu pour être induit par le TLR4 à la surface des cellules immunes, ce qui conduit à l'induction de cytokines inflammatoires (Yu et al., 2006). Les auteurs d'une étude de 2014 ont indiqué que HMGB1 est impliqué dans la pyroptose des macrophages exposés à de fortes doses de LPS (Xu et al., 2014). Ce processus demande l'endocytose de HMGB1 et est dépendant de la caspase-1, ce qui témoigne d'une interaction entre HMGB1 et la signalisation de l'inflammasome (Xu et al., 2014). Le rôle des signaux stériles dans l'inflammation induite par l'alcool est encore mal compris, cependant les données actuelles penchent vers l'implication des PAMP (dérivant de l'intestin) et des DAMP (provenant probablement des hépatocytes) dans l'inflammation hépatique induite par l'exposition à l'alcool. Le ciblage de ces DAMP représente ainsi une stratégie intéressante dans le traitement de la maladie alcoolique du foie.

## 2- Les stéatopathies non alcooliques

La contribution de l'activation de l'inflammasome dans des conditions de maladie non alcoolique du foie a reçu un intérêt considérable de la part des chercheurs (Ganz and Szabo, 2013; Mehal, 2014). La plupart des données suggèrent qu'une activation de l'inflammasome intervient durant le développement de syndromes métaboliques et de résistance à l'insuline (Lamkanfi and Kanneganti, 2012). Ces deux conditions prédisposent un individu au développement de la NAFLD ou de la NASH. Par ailleurs, des études ont montré le lien reliant des pathologies de l'alimentation et du métabolisme, telles l'obésité, le syndrome métabolique, le diabète de type 2 et la NAFLD, avec l'inflammation (Esser et al., 2014; Szabo and Csak, 2012). Par exemple, l'augmentation du taux d'IL-1 $\beta$  et l'activation de l'inflammasome NLRP3 sont associées au syndrome métabolique (Vandanmagsar et al., 2011). De la même façon, l'activation de l'inflammasome NLRP3 a été retrouvée dans les monocytes du sang de patients atteints d'un diabète de type 2 (Lee et al., 2013), et dans des études réalisées chez la souris les îlots de polypeptide amyloïde peuvent induire la production de caspase-1 et d'IL-1 $\beta$  dans les cellules dendritiques issues de la moelle osseuse (Masters et al., 2010). Curieusement, chez des animaux avec une NAFLD précoce, qui manifeste une

stéatose hépatique mais aucune inflammation, l'activation de l'inflammasome n'est pas encore observée dans le foie. L'initiation de l'activation de l'inflammasome localisée dans un tissu pourrait donc contribuer à la progression de la maladie voire même à une expansion vers d'autres organes dans le cas du syndrome métabolique (Csak et al., 2011a; Ganz et al., 2014). Dans des modèles précoces de NAFLD, l'augmentation de l'expression de composants de l'inflammasome, tels NLRP3, ASC ou la caspase-1, a été retrouvée dans le foie sans preuves d'une activation complète de l'inflammasome (absence du clivage de la caspase-1), révélant que seul des signaux limités sont disponibles pour l'activation de l'inflammasome (Csak et al., 2011a, 2014; Ganz et al., 2014). Au contraire, les auteurs ont trouvé des preuves d'une expression augmentée des composants de l'inflammasome et son activation lorsque la NAFLD est au stade de NASH (Csak et al., 2011a; Wree et al., 2014a). Chez l'Homme, il a pu être observé une augmentation de l'expression des composants de l'inflammasome, NLRP3, ASC, caspase-1 et pannexine dans la NASH (Csak et al., 2011a). Etant donné le microenvironnement cellulaire complexe du foie, la spécificité de l'activation de l'inflammasome dans la NASH est importante. Alors que l'inflammasome et ses fonctions ont été décrits à l'origine dans les cellules immunes et que les études de stéatohépatite alcoolique suggèrent une restriction spécifique aux cellules de Kupffer (Petrasek et al., 2012; Xiao et al., 2014), le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans la NAFLD et dans la NASH est plus complexe que ce qui était initialement prédis.

Dans la NASH, le rôle de l'inflammasome est conduit par les cellules parenchymateuses en plus des cellules immunes (Csak et al., 2011a, 2014; Henao-Mejia et al., 2012). Dans le modèle de NASH induite par un régime riche en MCD chez la souris, les cellules dérivées de la moelle osseuse ainsi que les cellules parenchymateuses contribuent à l'activation de l'inflammasome (Csak et al., 2014). Un rôle spécifique des hépatocytes dans l'activation de l'inflammasome dans la NASH est supporté par des études qui ont démontré que des acides gras saturés augmentent l'expression de composants de l'inflammasome et son activation dans les hépatocytes avec une production d'IL-1 $\beta$  (Csak et al., 2011a). Afin d'élucider les effets de l'activation de l'inflammasome dans les hépatocytes, des chercheurs ont utilisés des souris qui surexpriment constitutivement un NLRP3 activé (Wree et al., 2014a). Bien que les auteurs n'aient pas spécifiquement étudié la physiopathologie de la NASH, l'activation constitutive et globale de l'inflammasome NLRP3 conduit à la pyroptose des hépatocytes, une mort cellulaire dépendante de l'inflammasome (Schroder and Tschopp, 2010). Inversement, l'activation de l'inflammasome dans les cellules myéloïdes n'a pas conduit à une pathologie

du foie (Wree et al., 2014a). Si ces données pouvaient être reproduites dans un modèle physiologique de NASH, les résultats soutiendraient un rôle pathogénique majeur de NLRP3 dans les cellules parenchymateuses, incluant les hépatocytes. Dans une autre étude, l'inflammasome NLRP3 semble essentiel à la NASH. Ici, un régime CDAA induit la mort des hépatocytes, une inflammation et une fibrose hépatique, qui sont atténués par la déficience globale de NLRP3 (Wree et al., 2014b). L'effet opposé a été observé dans des souris avec un gain de fonction pour NLRP3 induit par le tamoxifène ; cependant dans ces souris, NLRP3 est exprimé globalement et n'est pas spécifique à un type cellulaire (Wree et al., 2014b). L'inflammasome des cellules épithéliales de l'intestin peut contribuer à la NASH en modifiant la configuration du microbiote intestinal. Dans une étude ayant examiné la composition du microbiote et la sévérité des maladies grasses du foie dans des souris génétiquement déficientes pour l'inflammasome NLRP3 ou NLRP6, il a été montré que l'altération de la balance microbienne physiologique de l'intestin amène à l'apparition de membres de la famille des Prevotellaceae et une augmentation des Porphyromonadaceae dans la microflore intestinale (Hena-Mejia et al., 2012; Mehal, 2013). La taille des colonies bactériennes était encore plus grande lorsque les souris recevaient un régime MCD afin d'induire une NASH, et leur abondance est associée avec la distribution de composants du microbiote au foie et une exacerbation de l'inflammation du foie (Hena-Mejia et al., 2012). Un lien entre la dysbiose et la NASH a été établi avec la découverte que les traitements antibiotiques améliorent les maladies du foie, et que la perturbation du microbiote et certains aspects du phénotype de la maladie peuvent être transférés aux souris *wild-type* en les faisant cohabiter avec des souris déficientes pour l'inflammasome (Hena-Mejia et al., 2012). Curieusement, l'exacerbation de la NASH mise en évidence chez les souris déficientes pour l'inflammasome ayant reçu un régime MCD ne dépend pas de l'inflammasome présent dans les cellules myéloïdes ou les hépatocytes. Ainsi, le rôle de l'inflammasome pourrait être attribué à des populations cellulaires alternatives, probablement les cellules épithéliales de l'intestin, et impliquant ainsi la régulation de l'homéostasie intestinale. Enfin, selon des études basées sur des populations, la NAFLD et la NASH sont plus fréquentes chez l'homme que chez la femme (Pan and Fallon, 2014). De façon intéressante, l'inflammasome est activé chez les souris mâles mais pas chez les femelles nourries avec un régime riche en gras qui induit la NAFLD et la NASH, suggérant une régulation de l'inflammasome spécifique au sexe des individus (Ganz and Szabo, 2013; Ganz et al., 2014). Les ligands et activateurs de l'inflammasome dans la NASH et la NAFLD sont partiellement compris. La déficience en Myd88, TLR2, TLR4 et TLR9 chez la souris atténue la NASH (Csak et al., 2011b, 2014;

Miura et al., 2010). Les ligands de l'activation des TLR impliquent probablement le LPS du microbiote intestinal et potentiellement d'autres signaux de danger provenant également du microbiote, ainsi des signaux de danger stériles qui peuvent activer les TLR tels HMGB1 (Csak et al., 2011b, 2014; Miura et al., 2010). Le deuxième signal de l'activation de l'inflammasome est probablement lié aux dommages hépatocytaires amorcés par les acides gras saturés, les ERO ou les esters de cholestérol (Matsuzaka et al., 2012; Szabo and Csak, 2012). Ces signaux de danger peuvent s'accumuler lors de la progression de la maladie, et ainsi la faire perdurer via l'inflammation par la voie des TLR, de l'inflammasome et des récepteurs aux cytokines. Malgré ses caractéristiques histopathologiques, la progression de la maladie à un stade avancée et le rôle de la signalisation immunitaire innée sont comparables entre la stéatohépatite alcoolique et la NASH, ainsi il est peu probable que les mêmes mécanismes immunopathologiques soient impliqués (Petrasek et al., 2013). Les différences spécifiques aux pathologies dans la signalisation immunitaire innée pourraient, du moins en partie, être attribuées à l'implication différentielle de l'inflammasome dans la stéatose alcoolique comparée à la NASH, mais des études additionnelles sont nécessaires pour apporter une vision plus compréhensible du mécanisme.

### 3- L'infection par le virus de l'hépatite C

En 2010, le VHC a infecté plus de 4 millions de personnes rien qu'aux Etats-Unis et 185 millions d'individus dans le monde (Messina et al., 2015). Le VHC est perçu par de nombreux PRR intracellulaires tels RIG-I ou les TLR 2, 3, 4, 7/8 et 9 et ils induisent la production d'IFN (Heim, 2013; Messina et al., 2015). Parmi les altérations immunes induites par le VHC, l'activation des monocytes et des macrophages, et l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires contribuent ensemble à la progression de la maladie du foie liée au VHC et de la fibrose (Dolganiuc et al., 2007; Messina et al., 2015). De plus, le VHC peut également activer le complexe inflammasome dans les monocytes et les macrophages et induire la production d'IL-1 $\beta$  sans induire celle de l'IFN de type I (Chattergoon et al., 2014). Dans une étude *in vitro* dans laquelle l'expression du TLR3, TLR7, TLR8 ou TLR9 était bloquée avec des siRNA dans l'hépatite C, l'activation de l'inflammasome a été montrée induite via le TLR7 (Chattergoon et al., 2014). L'implication de NLRP3, ASC et de la caspase-1 dans l'activation d'IL-1 $\beta$  médiée par le VHC dans les cellules de la lignée THP-1 a été confirmée (Chen et al., 2014). L'activation de l'inflammasome dans les monocytes de patients infectés par le VHC donne lieu à la production d'IL-18, qui en retour active les cellules NKT (Serti et al., 2014). Le VHC a

également été retrouvé impliqué dans l'activation de l'inflammasome *in vitro* (Burdette et al., 2012). Pris ensemble, ces données suggèrent que l'activation de l'inflammasome et la production d'IL-1 $\beta$  sont présents dans de multiples compartiments cellulaires dans le foie de patients infectés par le VHC.

#### 4- Dommages hépatiques induits par le paracétamol

Les dommages hépatiques liés à un surdosage de paracétamol peuvent être schématiquement divisés en trois étapes très imbriquées : l'initiation, l'amplification, et l'inflammation (Jaeschke et al., 2012). Lors de l'étape d'initiation, une forte concentration de paracétamol est métabolisée en un métabolite réactif, le N-acetyl-p-benzoquinone imine, qui déplete la cellule en glutathion, entraîne la formation d'adduits aux protéines et amorce les dommages du foie et la nécrose hépatocytaire. Durant la phase d'amplification, les dommages mitochondriaux sont acquis et la sévérité de la nécrose hépatocytaire augmente (McGill et al., 2012). Ces deux étapes sont cruciales pour prédire la survie des patients. Une étude pilote chez l'Homme a permis en effet de montrer que des marqueurs de dommages mitochondriaux, relargués dans la circulation durant la phase d'amplification, servent à prédire l'issue (McGill et al., 2014).

Lors de la troisième phase, les hépatocytes en état de mort cellulaire relarguent des DAMP qui activent l'inflammasome et induisent une réaction inflammatoire (Imaeda et al., 2009; Kubes and Mehal, 2012). Cependant, le rôle de cet événement final dans l'étendue de la mort hépatocytaire et l'issue de l'hépatotoxicité au paracétamol restent controversés (Jaeschke et al., 2011; Williams et al., 2010, 2011a). Lorsque les DAMP sont libérés par les hépatocytes nécrosés, les fragments d'ADN, l'HMGB1 nucléaire, les *heat shock proteins* et les activateurs de l'inflammasome, tels l'acide urique et l'ATP, sont reconnus par les cellules immunitaires (Kubes and Mehal, 2012). Ce mécanisme est le principal responsable de l'activation de l'inflammasome observée dans les lésions hépatiques induites par le paracétamol (Sander and Blander, 2009). Toutefois, le fait que l'exposition au paracétamol peut conduire directement à la formation de l'inflammasome dans les cellules immunes est actuellement inconnu. Chez la souris, la production d'IL-1 $\beta$  est augmentée dans le foie en réponse au paracétamol (Imaeda et al., 2009; Williams et al., 2010). Il faut noter que les niveaux sériques d'ALT, un marqueur des dommages hépatocytaires, sont augmentés de 500 fois en comparaison aux souris témoins traitées avec une solution saline, tandis que l'expression de la pro-IL-1 $\beta$  dans le foie augmente seulement de 5 fois (Imaeda et al., 2009). L'absence de la signalisation de l'IL-1 $\beta$  dans les souris déficientes pour le récepteur de l'IL-1 apporte une protection considérable



contre l'inflammation et la mort hépatocytaire induite par le paracétamol (Chen et al., 2007; Imaeda et al., 2009). Cependant, ces découvertes n'ont pas pu être reproduites dans une étude ultérieure dans laquelle une forte dose d'IL-1 $\beta$  (20  $\mu$ g/kg) a été administrée après celle de paracétamol, et dans laquelle il a été observé un recrutement de neutrophiles dans le foie mais qui n'a pas augmenté les dommages hépatiques induits par le paracétamol seul (Williams et al., 2010). Des contradictions similaires ont été relevées dans des études ayant examinées les composants de l'inflammasomes dans des lésions du foie induites par le paracétamol. La déficience génétique de NLRP3, ASC, caspase-1 ou du récepteur P2X7 a un effet protecteur (Hoque et al., 2012; Imaeda et al., 2009), cependant certaines études n'ont pas pu reproduire ces résultats (Williams et al., 2011b). En effet, la déficience en ATP dans des souris *knockout* pour le récepteur P2X7 peut aggraver l'étendue des dommages hépatocytaires et de l'inflammation induit par le paracétamol (Kataoka et al., 2014). A l'inverse, la déplétion en acide urique dans les souris surexprimant l'uricase améliore l'inflammation induite par le paracétamol mais n'apporte aucune protection contre les dommages hépatocytaires (Kono et al., 2010).

Ces divergences ont été attribuées à de multiples facteurs, incluant la variabilité de la toxicité du paracétamol en fonction des modèles utilisés chez les rongeurs, le statut nutritionnel et les différences de microbiote entre les souches de souris ainsi que les équipements d'animalerie utilisés (Jaeschke et al., 2012; Kubes and Mehal, 2012; Williams et al., 2011a). Sans aucun doute, la signalisation du système immunitaire et l'inflammasome sont activés lors d'une hépatotoxicité au paracétamol (Antoniades et al., 2014; Imaeda et al., 2009). Il semble donc que les DAMP et l'inflammasome sont des éléments clés de l'inflammation hépatique induite par le paracétamol (Jaeschke et al., 2011; Williams et al., 2010, 2011a).

##### 5- Dommages induits par l'ischémie-reperfusion

L'ischémie-reperfusion induit des dommages tissulaires lors des transplantations hépatiques ou chez des patients à la suite d'une défaillance cardiaque, d'hémorragies ou lors d'un sepsis, et se traduit par une anémie et donc une diminution du transport de l'oxygène au foie. Lors de la phase initiale, l'hypoxie interfère avec les fonctions des hépatocytes et des cholangiocytes, toutes les deux fortement dépendantes du métabolisme oxydatif. Si le sang et l'apport en oxygène sont restaurés (reperfusion), les hépatocytes et les cholangiocytes sont exposés à un stress oxydant qui amorce la mort des cellules (dommages de la reperfusion) (Abu-Amara et al., 2010; Weigand et al., 2012). Dans un contexte clinique, les dommages de l'ischémie-

reperfusion contribuent à retarder la fonction des greffons de foie après transplantation et à la défaillance du foie chez des patients ayant eu un choc ou une cholangiopathie ischémique, entraînant sur le long terme une cirrhose biliaire secondaire (Weigand et al., 2012; Zhai et al., 2013). Les dommages de la reperfusion et la mort des hépatocytes initient la libération de DAMP, la production d'ERO, l'activation de l'inflammasome, et l'infiltration par des cellules immunitaires (Jaeschke, 2011). Ces lésions sont couramment observées dans le cas d'un foie préalablement affecté par une première pathologie, notamment après ischémie-reperfusion de greffons hépatiques stéatosés provenant de donneurs décédés (Gabrielli et al., 2012) ou encore chez des patients avec une NASH ou une NAFLD pré-existante, dans lesquels un choc septique induit une hépatite ischémique (DuBray et al., 2015; Farrell et al., 2008). Dans des études utilisant des modèles de dommages induits par une ischémie-reperfusion chez la souris, une déficience en NLRP3 empêche l'activation de l'inflammasome, la libération d'IL-1 $\beta$ , d'IL-18 et d'autres cytokines inflammatoires et réduit l'étendue des lésions (Huang et al., 2013; Zhu et al., 2011). Un effet protecteur similaire est observé dans une autre étude réalisée chez des souris génétiquement déficientes pour les composants de l'inflammasome ASC et caspase-1 (Huang et al., 2013; Kamo et al., 2013), ou bien traitées par le Z-YVAD-FMK, un inhibiteur spécifique de la caspase-1 (Shimizu et al., 1996). Ces résultats sont soutenus par des études chez l'animal dans lesquelles des pré-traitements par l'anakinra, ou bien l'injection d'ADNc codant pour il1ra ou encore l'administration d'anticorps neutralisant l'IL-18 dans le foie réduisent fortement les dommages liés à l'ischémie-reperfusion, l'inflammation et la mortalité (Harada et al., 2002; Shito et al., 1997; Takeuchi et al., 2004).

La nature des DAMP activant l'inflammasome dans l'ischémie-reperfusion n'a pas encore été complètement élucidée mais des chercheurs suggèrent que les histones libérés lors de la mort des hépatocytes activent l'inflammasome dans les cellules de Kupffer, un mécanisme dépendant du TLR9 et des ERO (Huang et al., 2013). Dans une autre étude, l'utilisation d'un inhibiteur du canal ATP pannexine-1, et d'un anticorps anti-cathepsine B atténue l'activation de l'inflammasome induite par l'ischémie-reperfusion ainsi que les dommages hépatiques (Kim et al., 2015), ce qui suggère que l'ATP et des matériaux cristallins, tels que l'acide urique ou le cholestérol, sont impliqués dans ce contexte. Dans une étude publiée en 2014, les auteurs ont suggéré que NLRP3 contribuait aux dommages induits par l'ischémie-reperfusion indépendamment de l'inflammasome en régulant la fonction des chimiokines et en recrutant les neutrophiles dans le foie (Inoue et al., 2014). Aucune donnée n'a encore montrée une

implication directe des inflammasomes dans la mort hépatocytaire dans des conditions hypoxiques.

## 6- La fibrose hépatique

La fibrose hépatique est sous la dépendance directe et indirecte de l'activation de l'inflammasome.

La voie directe est liée à l'expression de l'inflammasome dans les CEF, la population cellulaire du foie la plus fibrogénique (Ouyang et al., 2013; Watanabe et al., 2009). Les activateurs canoniques de l'inflammasome, tels que les cristaux d'acide urique, peuvent activer les CEF primaires de souris et des lignées humaines de CEF (Watanabe et al., 2009). Les cristaux d'acide urique augmentent l'expression du TGF- $\beta$ 1, une cytokine pro-fibrogénique majeure, active les cellules étoilées, et induit la production de collagène et sa déposition dans la MEC. Ces modifications n'ont pas lieu lorsque les CEF sont déficientes en ASC (Watanabe et al., 2009).

La voie indirecte est liée à l'activation des cellules étoilées en réponse à l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 libérées par les cellules de Kupffer. Dans ce scénario, les PAMP en provenance de l'intestin et les DAMP en provenance des hépatocytes activent l'inflammasome dans les cellules de Kupffer, et l'IL-1 $\beta$  libérée par ces cellules contribue à l'activation des CEF *via* le récepteur à l'IL-1 (Weiskirchen and Tacke, 2014). Cependant il existe un autre mécanisme indépendant de l'inflammasome qui implique la communication entre les cellules de Kupffer et les CEF. Spécifiquement, la fibrogénèse du foie nécessite l'exposition des cellules étoilées au LPS provenant de l'intestin, qui peut diminuer l'expression de *BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog* (BAMBI), un récepteur-leurre inhibiteur exprimé à la surface des cellules étoilées. La diminution de l'expression de BAMBI permet aux cellules étoilées de répondre au TGF- $\beta$ 1 sécrété par les cellules de Kupffer et ainsi d'initier leur transformation en myofibroblastes (Seki et al., 2007). Aucune expérimentation démontrant un rôle de l'IL-18 dans l'activation des CEF n'a été montré. Dans une seule étude disponible, l'IL-18 n'activait pas les CEF *in vitro* (Khan et al., 2008).

Dans des modèles expérimentaux de fibrose hépatique chez la souris, les niveaux d'IL-1 $\beta$  ont été retrouvés élevés et la déplétion du récepteur 1 à l'IL-1 améliore le phénotype fibrotique (Gielsing et al., 2009). De plus, chez les rats, en absence de signalisation IL-1 il y a une atténuation de la fibrogénèse hépatique induite par le DMN ou bien le TAA (Gielsing et al.,

2009). Dans la même situation, l'expression des MMP matricielles et des TIMP est modulée par l'IL-1, contribuant ainsi à modifier la fibrose et le remodelage tissulaire (Gieling et al., 2009). Dans un modèle de fibrose hépatique induite par le tetrachlorure de carbone ou le TAA, les niveaux de TGF- $\beta$ 1 et de collagène de type I  $\alpha$ 1 étaient fortement réduits dans les souris déficientes en NLRP3 ou en ASC (Gieling et al., 2009).

Le mécanisme général de la fibrogénèse s'applique probablement à la majorité des maladies chroniques du foie, cependant, aucune preuve directe n'existe pour soutenir ou écarter l'implication de l'inflammasome dans la fibrose hépatique dans des maladies autres que la maladie alcoolique du foie et la NASH.

Des études mécanistiques sont nécessaires pour vérifier si les effets pro-fibrogéniques liés à l'activation de l'inflammasome sont le résultat de l'activation directe des CEF par les DAMP ou bien d'une activation indirecte de ces cellules via l'activation au préalable des cellules de Kupffer par les DAMP qui induit la libération d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18.

### **C- Rôle de l'IL-1 $\beta$ dans les pathologies du foie**

L'IL-1 $\beta$  est une cytokine pro-inflammatoire dont les niveaux sont augmentés dans les patients atteints d'une maladie alcoolique (Tilg et al., 1992). Dans le foie, ce sont les macrophages résidents du foie, les cellules de Kupffer, qui produisent des quantités significatives d'IL-1 $\beta$  (Miura et al., 2010). Cette cytokine agit de façon autocrine ou bien paracrine en activant le récepteur IL-1R1. L'activation de ce récepteur peut être inhibée par l'action d'une cytokine de la famille de l'IL-1 avec une plus forte affinité pour le récepteur et qui s'appelle l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra). Des observations tardives suggèrent que l'IL-1 $\beta$  est sécrétée de façon indépendante de la voie « classique » du réticulum endoplasmique-Golgi (Rubartelli et al., 1990). Le mécanisme moléculaire par lequel l'IL-1 $\beta$  est sécrétée doit encore être clarifié. Certaines études suggèrent que la caspase-1 est présente dans les lysosomes sécrétoires avec d'autres protéines lysosomales et la pro-IL-1 $\beta$  (Andrei et al., 2004). Andrei et al. ont montré que l'efflux potassique induit par l'ATP permet l'activation dépendante du calcium de la phospholipase C, suivie par l'activation de la phospholipase A2 et éventuellement l'exocytose et la libération d'IL-1 $\beta$  (Andrei et al., 2004). Récemment, la pyroptose a été proposée comme nouveau mécanisme permettant la libération d'IL-1 $\beta$  (Dinarello, 2011). Il est à noter de façon importante que l'IL-1 $\beta$  possède une boucle d'auto-régulation. La protéine IL-1 $\beta$  ou IL-1 $\alpha$  active et sécrétée peut activer le complexe du récepteur à l'IL-1 $\beta$ . Par cette signalisation, faisant intervenir la signalisation du Myd88 puis

de la voie NF- $\kappa$ B, l'IL-1 $\beta$  augmente la transcription de son propre précurseur, ainsi que la synthèse de composants de l'inflammasome (Bauernfeind et al., 2009; Dinarello, 2011; Dinarello et al., 1987; Goldbach-Mansky et al., 2006). Cette boucle d'amplification suggère que de faibles quantités d'IL-1 $\beta$  peuvent avoir un effet biologique significatif.

Les traitements avec de l'IL-1Ra ont permis d'ailleurs d'améliorer les symptômes présents dans plusieurs maladies autoimmunes dont l'arthrite rhumatoïde (Mertens and Singh, 2009) et le syndrome autoinflammatoire (Dinarello, 2009). De plus, à l'inverse des thérapies ciblant le TNF- $\alpha$ , ce médicament n'est pas associé à des complications infectieuses (Opal et al., 1997).

Dans de nombreuses pathologies liées à la fibrose hépatique, l'IL-1 $\beta$  est devenue une cytokine émergente. Dans des dommages hépatiques induits par le paracétamol, des souris *knockout* pour la caspase-1 sont protégées avec une meilleure survie, moins d'inflammation et moins de dommages hépatiques (Imaeda et al., 2009). Les auteurs ont montré dans ce modèle que la signalisation du TLR9 détectant l'ADN libéré par les hépatocytes ayant subi un stress oxydant, activait l'inflammasome et permettait également d'augmenter la synthèse de l'ARNm de l'IL-1 $\beta$  (Imaeda et al., 2009). Par ailleurs, dans la stéatose hépatique non-alcoolique induite par un régime riche en CDAA pendant 22 semaines, ayant induit une stéatohépatite, une fibrose et une insulino-résistance chez la souris, des souris *knockout* pour le TLR9 sont moins sensibles à la pathologie (Miura et al., 2010). Il a été observé que chez ces souris, seule l'expression de l'IL-1 $\beta$  était supprimée parmi d'autres cytokines. Dans ce même modèle, des souris *knockout* pour le récepteur à l'IL-1 sont également protégées de la stéatohépatite et de la fibrose. Les cellules de Kupffer isolées chez ces animaux peuvent par ailleurs sécréter de l'IL-1 $\beta$  en réponse au CpG oligodeoxynucleotide. L'IL-1 $\beta$  mais pas le CpG oligodeoxynucleotide induit une accumulation de lipide dans les hépatocytes responsable de l'inactivation du NF- $\kappa$ B, conduisant ainsi à la mort des hépatocytes. De plus, sur les CEF isolées de ces souris, l'IL-1 $\beta$  conduit à une réponse fibrogénique sur ces cellules marquée par l'augmentation de l'expression du TIMP-1 (Miura et al., 2010).

Gielsing et ses collègues ont montré également que l'IL-1 $\beta$  participe à la progression de dommages hépatiques vers la fibrose (Gielsing et al., 2009). En effet, cette cytokine est très rapidement exprimée en réponse aux dommages hépatiques, ainsi que la MMP-9 et la MMP-13, ceci avant l'augmentation de l'activation des fibroblastes et de la fibrogénèse. Les souris déficientes en récepteurs à l'IL-1 sont mieux protégées des dommages hépatiques et ne montrent pas de signe de fibrose. De même, la déficience en IL-1 chez des souris avec une

cirrhose avancée permet de réduire partiellement l'expression du collagène de type I et III et les zones de septa fibrotiques. Enfin dans la phase précoce des dommages hépatiques, les niveaux d'IL-1 $\beta$  sont corrélés à l'expression de la MMP-9. Cette MMP-9 est co-localisée dans des phases plus tardives avec des cellules positives pour la desmine, suggérant que ce sont les CEF qui sécrètent la MMP-9 *in vivo*. Or des souris déficientes en MMP-9 sont également partiellement protégées des dommages hépatiques et de l'activation des CEF. Ainsi les auteurs ont conclu que l'IL-1 $\beta$  permet, avec l'action conjointe d'autres cytokines, de contrôler la progression des dommages en fibrose hépatique par le biais de l'activation des CEF *in vivo* (Gielsing et al., 2009).

Dans un autre modèle de dommages hépatiques induit par des ligands activateurs du TLR9 ou du TLR2, les auteurs ont montré que des souris déficientes en *interferon regulatory factor-7* ou bien en IFN- $\alpha/\beta$  *receptor* 1, présentant une perturbation dans la production ou la signalisation de l'IFN de type I, ont respectivement une augmentation des dommages hépatiques et de l'inflammation, une diminution du recrutement de cellules dendritiques, et une augmentation de TNF- $\alpha$  par les cellules mononucléaires du foie (Petrasek et al., 2011). Ces souris présentent également des niveaux d'IL-1Ra plus faibles que les souris sauvages. Ils ont montré que l'IL-1Ra permet de protéger les hépatocytes de la cytotoxicité induite par le TNF- $\alpha$  et rendue plus sensible sous l'influence d'un traitement par l'IL-1 $\beta$ . Ainsi des souris exposées à des ligands du TLR9 sont protégées par l'injection d'IFN de type I ou bien par de l'IL-1Ra, démontrant que le mécanisme par lequel l'IFN de type I exerce des effets anti-inflammatoires est dépendant de sa capacité à induire l'expression de l'IL-1Ra (Petrasek et al., 2011).

Dans un modèle de maladie alcoolique du foie induite chez la souris, il a été montré que l'inactivation de l'IL-1 $\beta$ , soit par injection d'IL-1Ra, soit par déficience du gène codant pour le récepteur à l'IL-1, permet de réduire la stéatose, l'inflammation et les dommages hépatiques ainsi que la fibrose hépatique. Dans ce modèle, les cellules de Kupffer sont responsables de l'aspect pathologique par le biais de l'activation de l'inflammasome conduisant à l'expression d'IL-1 $\beta$  par ces cellules. De plus, des doses physiologiques d'IL-1 $\beta$  permettent d'induire une stéatose ainsi que l'augmentation de l'expression de la chimiokine CCL2/MCP-1 par les hépatocytes et augmentent la signalisation inflammatoire des macrophages vis-à-vis de l'activation du TLR4 (Petrasek et al., 2012).

Dans une étude menée chez le rat traité avec du CCl<sub>4</sub>, il a été montré une élévation du taux de TIMP-1, 24 heures après l'injection. Un prétraitement des rats avec de l'anakinra réduit de 75% le niveau de cette expression du TIMP-1. En revanche, l'inactivation de l'IL-1 $\beta$ , mais pas du TNF- $\alpha$  dans ce modèle induit également l'expression de la MMP-9 (Roderfeld et al., 2006).

Il a également été observé que des polymorphismes du gène codant pour l'IL-1 $\beta$  influencent la susceptibilité des personnes à développer un hépatocarcinome dans des pathologies chroniques du foie (Sakamoto et al., 2008). A l'opposé de cette constatation, une autre étude a montré que l'expression de la caspase-1 est diminuée dans le carcinome hépatocellulaire (Fujikawa et al., 2000). Cependant, une autre étude menée dans des lignées cellulaires de carcinome hépatocellulaire et d'hépatomes, ont détecté une activité de la caspase-1 plus élevée dans des conditions d'hypoxie (Yan et al., 2012).

# Objectifs





## Objectifs

La fibrogénèse est un processus de réponse physiopathologique qui survient dans de nombreux tissus de l'organisme après des agressions répétées ou chroniques, telles que des infections, des réactions auto-immunes, ou des lésions mécaniques (Lee and Friedman, 2011; Tomasek et al., 2002; Wynn, 2007). Le plus souvent, la cause initiale des dommages est amplifiée par une réponse inflammatoire qui conduit à un dépôt excessif de composants de la MEC, aboutissant à une fibrose qui peut entraîner la défaillance de l'organe (Lee and Friedman, 2011). Dans le cas des infections, les cellules immunitaires qui résident dans les tissus peuvent reconnaître l'invasion de pathogènes *via* des récepteurs de type PRR (Kawai and Akira, 2010). Les PRR peuvent être activés par la reconnaissance de motifs moléculaires particuliers soit associés aux pathogènes (les PAMP) ou associés aux cellules agressées (les DAMP), et provoquant ainsi une inflammation « stérile », en absence de pathogènes (Takeuchi and Akira, 2010). Les inflammasomes sont un groupe de complexes protéiques qui reconnaissent divers stimuli inflammatoires qui incluent les PAMP et les DAMP et qui contrôlent l'activation de l'enzyme protéolytique caspase-1, qui en retour permet la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18 (Davis et al., 2011; Schroder and Tschopp, 2010). Parmi les inflammasomes, le NLRP3 est l'inflammasome le mieux caractérisé. Il contrôle l'activité de la caspase-1 par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice ASC.

L'inflammasome est impliqué dans le processus de fibrogénèse dans de nombreuses pathologies et tissus. Il participe notamment au développement de la fibrose pulmonaire chez la souris en réponse à la bléomycine. En effet, il a été montré que des souris génétiquement déficientes pour des composants de l'inflammasome et de la voie de l'IL-1 $\beta$  sont protégées des effets de la bléomycine (Gasse et al., 2007). Depuis ces travaux, plusieurs études ont montré l'implication de l'inflammasome dans différents modèles de fibroses hépatiques (Dixon et al., 2013; Gieling et al., 2009; Petrusek et al., 2012; Wree et al., 2014). Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquelles l'inflammasome est impliqué dans cette pathologie sont encore incertains.

En terme de mécanisme, les monocytes infiltrants jouent un rôle crucial dans la progression de l'inflammation du foie et de la fibrose chez le rongeur (Duffield et al., 2005; Imamura et al., 2005; Karlmark et al., 2009; Mitchell et al., 2009; Pellicoro et al., 2014; Seki et al., 2009a; Wynn and Barron, 2010). Lors de dommages hépatiques, les macrophages résidents du foie, ou cellules de Kupffer, sont constamment renouvelés en grande partie par les monocytes du

sang (Heymann et al., 2009; Klein et al., 2007). Ces macrophages sont d'ailleurs la source majeure de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , qui perpétuent l'inflammation chronique, et pourraient même activer directement les CEF, principales sources de la fibrogénèse, conduisant à leur prolifération, leur survie et leur transdifférenciation en myofibroblastes capables de produire du tissu cicatriciel (Duffield et al., 2005; Friedman and Arthur, 1989; Imamura et al., 2005; Karlmark et al., 2009; Luedde and Schwabe, 2011; Rivera et al., 2001; Seki et al., 2007).

Compte tenu de leur position anatomique dans l'espace de Disse, entre l'endothélium fenestré des sinusoides et les hépatocytes, les CEF sont idéalement situées pour interagir avec de nombreuses cellules du foie. Dans un foie fibrotique, les macrophages sont situés à proximité immédiate des myofibroblastes activés dans les zones de tissus cicatriciels (Duffield et al., 2005; Fallowfield et al., 2007; Liu et al., 2010). Cependant les interactions entre les macrophages et les CEF sont très complexes notamment du fait de l'hétérogénéité de ces cellules. Il a été en effet montré que ces cellules, selon le contexte de la pathologie, exercent plusieurs fonctions dans le foie. En effet, la déplétion des cellules de Kupffer lors la phase de dommages hépatiques induit par du tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) chez la souris, conduit à la réduction des niveaux de fibrose hépatiques. A l'inverse, lors de la phase de résolution de la fibrose où le CCl<sub>4</sub> n'était plus administré, la déplétion des cellules de Kupffer conduit à un retard important de la réparation du foie (Duffield et al., 2005). Cette étude montre bien que les macrophages sont des régulateurs importants du foie, pouvant être soit impliqués dans l'aggravation des dommages hépatiques en exacerbant la réaction inflammatoire, soit impliqués dans la résolution de la fibrose développée en sécrétant des MMP capables de dégrader le tissu cicatriciel (Iimuro et al., 2003; Parsons et al., 2004; Pellicoro et al., 2012; Ramachandran et al., 2012; Roderfeld et al., 2006).

L'objectif général de cette thèse était d'étudier le rôle de l'inflammasome dans le développement de la fibrose hépatique, et plus particulièrement de comprendre si son activation dans les macrophages peut contribuer à l'activation des fibroblastes hépatiques et conduire à un processus de fibrogénèse.

Nous avons pour cela poursuivi, dans un premier temps, les travaux engagés lors de mon stage en master 2. Nous avons alors développé un modèle de fibrose hépatique chez la souris par administrations répétées de CCl<sub>4</sub> et avons étudié le rôle d'un composant important de la signalisation de l'inflammasome-NLRP3 représenté par les récepteurs purinergiques sensibles à l'ATP extracellulaire en administrant un médicament antagoniste non-sélectif de ces

récepteurs, la suramine. Ce travail a été décrit dans la revue « *Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis* » publiée dans *Bioscience reports*. Sur la base de ce modèle, nous avons étudié les réponses des souris génétiquement déficientes pour le récepteur à l'IL-1, pour le récepteur purinergique P2X7 et pour le NLRP3.

Nous avons ensuite voulu connaître les mécanismes moléculaires pouvant assurer le lien entre l'environnement inflammatoire et le mécanisme de fibrogénèse *in vitro* dans une lignée cellulaire de CEF, la lignée LX-2 (Xu et al., 2005). Nous avons traité ces cellules avec des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires retrouvées élevées chez l'Homme ou l'animal lors de pathologies chroniques du foie, telles que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-8 et l'IL-6, en comparaison à la cytokine pro-fibrotique TGF- $\beta$ 1. Nous avons également évalué l'effet inhibiteur de deux médicaments couramment utilisés lors de pathologies inflammatoires, l'anticorps monoclonal anti-TNF- $\alpha$  Infliximab (Remicade<sup>®</sup>), et l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 Anakinra (Kineret<sup>®</sup>). Ce travail a donné lieu à un article publié dans *Plos One* : « *Characterization of the MMP/TIMP imbalance and collagen production induced by IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  release from human hepatic stellate cells* » (Robert et al., 2016).

Enfin, dans un troisième objectif de thèse, nous avons utilisé la lignée monocytaire THP-1 et des macrophages humains différenciés à partir de monocytes isolés de poche de sang afin de réaliser des co-cultures par une approche de milieu conditionné ou d'insert de culture, avec les cellules de la lignée LX-2 précédemment étudiée, ainsi que des myofibroblastes humains en culture primaire. Ce travail a donné lieu à la rédaction d'un article soumis dans *Journal of Molecular Biology* intitulé « *Influence of inflammasome-activation in macrophages on fibrogenic activities of human hepatic stellate cells* ».



# Résultats



# **Chapitre I : Implication de l'inflammasome et de la signalisation de l'IL-1 $\beta$ dans le développement de la fibrose hépatique chez un modèle murin traité au CCl $_4$**

## **1- Contexte scientifique**

La fibrose caractérisée par l'augmentation de l'expression des composants de la MEC est contrôlée par des enzymes capables d'en dégrader les composants, qu'on appelle les MMP. Ces MMP sont régulées par l'action d'inhibiteurs endogènes, les TIMP. Un déséquilibre MMP/TIMP dans un sens ou dans l'autre peut entraîner le maintien ou la résolution de cette fibrose.

Lorsqu'une fibrose hépatique est induite chez l'animal par l'administration de CCl $_4$ , une forte augmentation de la libération d'IL-1 $\beta$  est observée dès 24h après l'injection (Salazar-Montes et al. 2000). Cette cytokine est régulée par l'activation de l'inflammasome, un complexe protéique majoritairement activé dans le foie à la suite de la libération de signaux de danger par les cellules lésées et faisant intervenir les récepteurs purinergiques P2X ou P2Y.

Puisque l'inflammasome est impliqué dans le processus de fibrogénèse dans plusieurs organes dont le foie (Dixon et al., 2013; Gieling et al., 2009; Petrsek et al., 2012; Wree et al., 2014), nous avons voulu mettre en évidence son implication dans un modèle expérimental de fibrose hépatique induit par le CCl $_4$  chez la souris, notamment vis-à-vis de la balance MMP/TIMP.

Dans ces expériences, nous avons voulu caractériser d'une part l'implication des récepteurs purinergiques, mais également la signalisation de l'IL-1 $\beta$  via son récepteur et ses co-facteurs comme Myd88.

Revue 1 : « *Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis* ».



## 2- Matériel et méthodes

### 2.1- Traitements des souris

Les souris sauvages (*wild-type*, WT) utilisées sont des mâles adultes C57Bl/6JRj (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, France) âgés de 8 à 10 semaines. Les souris génétiquement déficientes pour les gènes codant pour NLRP3, P2RX7 et IL-1R1 ont été développées à Orléans, dans l'unité mixte de recherche INEM (Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires - UMR CNRS 7355) dans la même souche C57Bl/6JRj que les souris WT. Dans une première série d'expérimentations, un groupe de souris WT (n=5) a été traité par une injection intrapéritonéale (IP) de 100 µL de tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) de chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) dilué au 1/12<sup>ème</sup> dans l'huile de tournesol (le véhicule) à raison de 0,35 mL de CCl<sub>4</sub> par kg. Le groupe de souris témoin (n=5) est traité par une injection IP de 100 µL d'huile de tournesol. Vingt-quatre heures après, les souris sont euthanasiées par injection de pentobarbital (175 mg/kg) et les foies sont prélevés. Dans une deuxième série d'expérimentations, les souris sont traitées 2 fois par semaine pendant 3 semaines avec 0,35 mL/kg de CCl<sub>4</sub> ou par l'huile de tournesol en IP. Tout d'abord, un premier groupe de souris WT (n=14) ont reçu des injections IP de suramine de chez Sigma-Aldrich, à la dose de 20 mg/kg, 5 jours par semaine pendant 3 semaines, à raison de 100 µL par souris, ou des injections IP du véhicule (NaCl 0,9%) dans les mêmes conditions chez un deuxième groupe de souris WT (n=14). En parallèle, 2 jours par semaine, un troisième groupe de souris WT (n=8) reçoivent le CCl<sub>4</sub> (0,35 mg/kg) ou bien l'huile de tournesol dans un quatrième groupe de souris WT (n=6). Dans une troisième série d'expérimentations, des groupes de souris WT (n=6), NLRP3<sup>-/-</sup> (n=5), P2RX7<sup>-/-</sup> (n=7), et IL-1R1<sup>-/-</sup> (n=5) sont traités avec 0,35 mL/kg de CCl<sub>4</sub> à raison de 2 fois par semaine pendant 3 semaines, et d'autres groupes de souris WT (n=4), NLRP3<sup>-/-</sup> (n=5), P2RX7<sup>-/-</sup> (n=5), et IL-1R1<sup>-/-</sup> (n=5) sont traités avec de l'huile de tournesol dans les mêmes conditions. A la fin des traitements, les souris sont euthanasiées par injection de pentobarbital (175 mg/kg) et les foies sont prélevés, ainsi que du sang.

## 2.2- Etude histologique

Les études histologiques ont été effectuées au sein de la plateforme d'histopathologie H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>, de l'UMS Biosit à l'Université de Rennes 1.

### 2.2.1- Traitements des échantillons de foie

Le plus gros lobe de foie est détaillé délicatement en deux morceaux. L'un est plongé dans l'isopentane refroidi au contact de l'azote liquide, puis introduit dans un tube froid qui est plongé dans l'azote liquide, en attendant d'être conservé à -80°C. L'autre morceau de lobe est conservé dans une solution de formaldéhyde dilué à 10% pour les analyses histologiques. Des morceaux de foies sont également congelés séparément à -80°C pour les extractions d'ARN.

### 2.2.2- Coloration au rouge Sirius

Au moins 48 heures après fixation dans le formol à 10%, les morceaux de foie sont soumis à une étape d'imprégnation (Automate SHANDON, modèle Excelsior ES) sur un programme de nuit : six passages dans l'alcool puis trois dans le toluène à température ambiante, suivi de trois passages dans la paraffine liquide à 60-62°C. Les échantillons de foie sont ensuite placés dans des cassettes et inclus dans la paraffine (Thermo electron corporation - SHANDON Histocentre 3). Le bloc de paraffine est débité en coupes de 4 µm d'épaisseur au microtome LEICA RM2145. Les coupes sont étalées et séchées sur une lame à l'étuve à 58°C. Les échantillons sont transférés dans un automate LEICA ST5020 pour subir un déparaffinage (trois passages dans le toluène suivi de deux passages dans l'alcool). Une coloration au rouge Sirius (Solution de rouge Sirius F3BA - référencée Gurr 34149) à 0,1% dans une solution saturée d'acide picrique pendant 1 heure est ensuite réalisée, suivie d'une contre-coloration à l'aide d'une solution d'hématoxyline de Mayer 1/10ème afin de visualiser les noyaux des cellules. Après un cycle de déshydratation (trois passages à l'alcool suivi de deux passages dans le toluène), les échantillons sont collés sur la lame. Les lames sont scannées pour l'analyse d'images avec le logiciel NIS - Elements AR 4.00.03 (Nikon®).

## 2.3- Extraction d'ARN

Les échantillons de foie congelés à -80°C dans l'isopentane refroidi au contact de l'azote liquide sont coupés au cryostat. Selon la taille des échantillons, entre 35 et 60 coupes de 10 µm d'épaisseur sont réalisées puis collectées et lysées avec 350 µL de solution de lyse (Tampon de lyse RA1 - Kit Macherey-Nagel NucleoSpin® RNAII) et 3,5 µL de β-mercaptoéthanol. Les échantillons sont vortexés vigoureusement puis stockés une nuit à -

20°C. Le lendemain, les tubes sont décongelés et placés sur des colonnes à filtre (NucleoSpin® Filter) reliées à un tube collecteur afin d'éliminer les débris cellulaires. Après centrifugation pendant 1 minute à 11000 g, 350 µL d'éthanol 70% sont ajoutés dans le tube collecteur. Après homogénéisation, la solution est transférée sur une colonne de purification d'ARN (NucleoSpin® RNAII Column) reliée à un tube collecteur. Après centrifugation pendant 30 secondes à 11000 g, la colonne est lavée par 350 µL de solution MDB (*Membrane Desalting Buffer* - Tampon optimisé pour la DNase I) puis de nouveau centrifugée 1 minute à 11000 g. 95 µL d'un mélange rDNase/Reaction Buffer pour rDNase sont ajoutés sur la colonne et un temps de 15 minutes d'incubation à température ambiante est respecté. A la fin de l'incubation, la rDNase est inactivée par 200 µL d'une solution « Buffer RA2 » et les échantillons sont centrifugés 30 secondes à 11000 g. L'éluât est éliminé et la colonne est lavée par 600 µL d'une solution « Buffer RA3 » suivi d'une centrifugation de 30 secondes à 11000 g puis par 250 µL de « Buffer RA3 » suivi d'une centrifugation de 2 minutes à 11000 g. Les colonnes sont placées sur de nouveaux tubes collecteurs et l'ARN purifié sur la colonne est élué avec 60 µL d'eau « *RNase free* » par centrifugation pendant 1 minute à 11000 g. Les ARN ainsi élués sont immédiatement stockés à -80°C.

#### 2.4- Réaction de transcription inversée

Les ARN totaux sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop® ND-1000 (Nyxor Biotech, Paris, France). Des échantillons d'ARN sont préparés à la concentration de 1 µg d'ARN totaux dans un volume de 25 µL d'eau « *RNase free* ». 25 µL d'une solution de réaction de transcription inverse (High Capacity cDNA Reverse Transcription kit - Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA) sont ajoutés par tube puis 10,5 µL d'eau « *RNase free* ». Les tubes sont incubés pendant 10 minutes à 25°C puis 120 minutes à 37°C et placés ensuite à 4°C. Les échantillons sont dilués dans un volume de 400 µL d'eau « *RNase free* » puis stockés à -20°C.

#### 2.5- Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (q-PCR)

Les mesures q-PCR sont réalisées avec 10 ng d'ADNc en plaque 384 puits ABI PRISM (Applied Biosystems™). Les mesures de fluorescence sont analysées à l'aide d'un thermocycleur « ABI PRISM 7900HT » (Applied Biosystems™). L'expression de deux gènes est étudiée en parallèle, un gène d'intérêt et le gène de référence : la GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Le « rapporteur » fluorescent utilisé est le « SYBR Green I » (SYBR Green I PCR Master Mix, Applied Biosystems™). Les couples d'amorces utilisées pour la réaction de q-PCR sont élaborés à l'aide d'un outil disponible sur le site « [idtdna.com](http://idtdna.com)

» et les séquences ont été soumises à un blast sur le site du ncbi pour vérifier leur spécificité. Les courbes d'amplification sont lues avec le logiciel SDS 2.3 (Applied Biosystems™) en utilisant la méthode comparative des cycles seuils. Les niveaux de chaque gène d'intérêt sont normalisés par rapport à celui de la GAPDH.

## 2.6- Dosage immunologique ELISA

Les échantillons de sang sont centrifugés et le plasma est collecté afin de doser les niveaux protéiques par technique immunologique à l'aide de kit ELISA duoset® de chez R&D Systems (Abingdon, UK), selon le protocole décrit par le fournisseur.

## 2.7- Etude statistique

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type standard à la moyenne (SEM) et sont analysés par le logiciel Prism (version 5.0, Graphpad Software, La Jolla, CA, USA). Selon les expériences, les variations entre les échantillons sont analysées par des tests de Student (tests t) ou par des tests ANOVA suivis d'un test de Newman-Keuls. Les valeurs de p value  $<$  à 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives.

### 3- Résumé de la revue

L'injection répétée de CCl<sub>4</sub> entraîne une augmentation significative du dépôt de collagène dès 24 heures après le traitement. Ce taux est encore plus élevé après 3 semaines d'hépatotoxicité (voir résultats complémentaires, figure 5). La fibrose est corrélée à des augmentations d'expression de marqueurs pro-fibrotiques tels que la MMP-2, le TIMP-1 et le collagène de type I. De façon intéressante, nous avons observé l'augmentation de l'expression d'éléments en relation avec la voie de l'inflammasome. Tout d'abord, NLRP3 est augmenté après 24 heures et 3 semaines de traitement. Ensuite, la pannexine 1, recrutée après activation du récepteur purinergique P2X7, est également augmentée après 3 semaines de traitement, ainsi que plusieurs récepteurs purinergiques, dont P2X1, P2Y6 et P2X7, dont la fixation de l'ATP contribue à l'activation de l'inflammasome-NLRP3. Cependant, ni la protéine adaptatrice de différenciation myéloïde 88 (Myd88) lié à la voie de signalisation du récepteur à l'IL-1, ni les taux circulants d'IL-1 $\beta$  ne sont augmentés dans ce modèle, suggérant une implication précoce de l'inflammasome dans ce modèle expérimental de fibrose hépatique.

# **Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis**

Sacha Robert<sup>1</sup>, Thomas Gicquel<sup>1</sup>, Tatiana Victoni<sup>2</sup>, Samuel Valença<sup>3</sup>, Emiliano Barreto<sup>4</sup>,  
Béatrice Bailly-Maître<sup>5</sup>, Elisabeth Boichot<sup>1</sup> and Vincent Lagente<sup>1</sup>

<sup>1</sup> : UMR991 INSERM, Université de Rennes 1, Rennes, France

<sup>2</sup>Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup>Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratory of Cell Biology, Federal University of Alagoas, Maceió-AL, Brazil.

<sup>5</sup>INSERM, U1065, Université de Nice Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, Nice,  
France.

## **Corresponding author:**

Pr. Vincent LAGENTE, PhD

UMR991 INSERM/Université de Rennes 1

Faculté de Pharmacie

2, avenue du prof Léon Bernard

35043 Rennes cedex, France

Email : [vincent.lagente@univ-rennes1.fr](mailto:vincent.lagente@univ-rennes1.fr)

## **Summary**

Fibrosis is a basic connective tissue lesion defined by the increase of the fibrillar extracellular matrix components in tissue or organ. Matrix metalloproteinases (MMPs) are a major group of proteases known to regulate the turn-over of extracellular matrix (ECM) and so they are suggested to be important in tissue remodeling observed during fibrogenic process associated with chronic inflammation. Tissue remodelling is the result of an imbalance in the equilibrium of the normal processes of synthesis and degradation of extracellular matrix components markedly controlled by the MMPs/TIMP imbalance. We previously showed a correlation of the differences in collagen deposition in the lungs of bleomycin-treated mice with a reduced molar pro-MMP-9/TIMP-1 ratio. Using the CCL<sub>4</sub> preclinical model of liver fibrosis in mice, we observed a significant increase in collagen deposition with increased expression and release of TIMP-1 both at 24h and three weeks later. This suggests an early altered regulation of matrix turnover involved in the development of fibrosis. We also demonstrated an activation of NLRP3-inflammasome pathway associated with the IL-1R/MyD88 signaling in the development of experimental fibrosis both in lung and liver. This was also associated with an increased expression of purinergic receptors mainly P2X<sub>7</sub>. Finally, these observations emphasize those effective therapies for these disorders must be given early in the natural history of the disease, prior to the development of tissue remodeling and fibrosis.

**Short title:** Fibrosis, matrix metalloproteinases and inflammasome pathway

**Key words:** Fibrosis, Matrix metalloproteinase, TIMP-1, inflammasome, purinergic receptors, Interleukin-1, Lung, Liver

## **1) Introduction**

Fibrosis is a basic connective tissue lesion defined by the increase of the fibrillar extracellular matrix components in a tissue or organ. It is a frequent component of a chronic inflammatory process but can also occur in other pathological conditions (vascular, metabolic, tumor pathologies). Sclerosis is related to fibrosis tissue induration. It is therefore a term macroscopic but often used as a synonym for fibrosis. The extracellular matrix (ECM) is a multimolecular complex structure comprising fibers of collagen, elastic fibers, glycoproteins of structure including fibronectin and laminin, and mucopolysaccharides. It is a medium dynamic, organized into a three dimensional network and physiologically in balance between the processes of synthesis, deposit in the extracellular environment and the process of degradation of these molecules. The constitution of fibrosis is the result of a disruption of the balance of the ECM: increase of process synthesis and deposition of the components of the ECM on a hand and decrease of their degradation on the other hand. Incorporated fibrosis may remain stable, worsen under the action of tissue attacks, or regress. Regression is a rare development, regarding recent fibrosis and requiring the disappearance of the initial stimulus of the fibrogenesis. If prolonged chronic inflammatory reaction spontaneous evolution is often fibrosis but all fibrosis are not inflammatory.

The aim of the present review is to analyse the involvement of the matrix metalloproteinases (MMPs) and the inflammasome pathway in the physiopathological development of two types of fibrosis: pulmonary fibrosis and liver fibrosis.

Pulmonary fibrosis is a severe and crippling disease with a poor prognosis. Its main histological features include alveolar septal lesions, abnormal reepithelialization, fibroblast proliferation and excessive deposition of ECM macromolecules due to abnormal wound



healing, and inflammation characterized by an influx of macrophages, neutrophils and lymphocytes. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) - usual interstitial pneumonia - is the most frequent form of interstitial pneumonia of unknown etiology (1,2). It has been assumed that IPF is the consequence of chronic inflammation (3). Nevertheless, treatment with glucocorticoids, which are the most potent anti-inflammatory drugs, did not have the expected improving effects on the development of pulmonary fibrosis (4). Thus, the links between inflammation and fibrosis have been extensively debated and need to be clarified (1,5). Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a key fibrogenic mediator, promoting ECM synthesis by fibroblasts, and down-regulating collagen degradation through the MMPs/TIMP (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase) imbalance (5-7).

Hepatic fibrosis develops following chronic inflammatory process under the influence of repeated stimulation. Its progress may cause the occurrence of cirrhosis or cancer of the liver, one of the deadliest, which makes it a major public health problem with 1.5 million deaths around the world (World Health Organization, 2002). The hepatic fibrogenesis appears in two phases during which the quiescent cells in the liver, or stellate cells, whose physiological role is to store vitamin A, play a crucial role. The first phase is characterized by an inflammatory phase in which the molecules from, for example, the metabolism of alcohol or the cleavage of proteins by hepatitis B or C viruses are capable of inducing the release of pro-inflammatory molecules by several cell types (8). During this initial phase, hepatocytes activate and recruit T cells while the biliary epithelial cells activate resident macrophages called Kupffer cells of the liver. The result is a production of free radicals and other soluble factors capable of stimulating hepatic stellate cells (9) and lead to their transformation. Following the first step, a fibrotic phase where the quiescent stellate cells turn into myofibroblasts and lead to the apoptosis of hepatocytes. This induces an accumulation of fibrotic cells such activated stellate cells and myofibroblasts from

fibrocytes differentiation. These cells also induce the recruitment of immune cells responsible for chronic inflammation. The fibrogenic process is associated with MMPs/TIMPs imbalance which produce excessive components of the extracellular matrix (ECM). The final stage of liver fibrosis is cirrhosis, characterized by the formation of regenerative nodules and a reduction in the size of the body. In 40% of cases, it is asymptomatic but may lead to complications such as portal hypertension, the liver failure and hepatocellular carcinoma (9,10).

## **2) The matrix metalloproteinases (MMPs)**

The matrix metalloproteinases (MMPs) form a group of structurally related extracellular zinc endopeptidases known for their ability to cleave one or several constituents of the extracellular matrix (11). Zymogen forms of the MMPs (pro-MMPs) are secreted into the extracellular space from a large number of cell types, where activation of the pro-MMPs in the local microenvironment can result in discrete alterations in the tissue architecture. MMP synthesis and functions are regulated by transcriptional activation, post-transcriptional processing (release of pro-domain, cell surface shedding), and control of activity by a family of endogenous inhibitors collectively known as tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP). Upon stimulation, many cell types including macrophages have been identified as producers of MMPs and TIMPs in a context of inflammatory process, strongly suggesting the involvement of MMPs in numerous inflammatory diseases. Based on this property, MMPs are not only put forward as physiological mediators of the “turnover” of the extracellular matrix but are also considered to be critical factors of the remodeling processes in pathological conditions (12). Indeed, a marked increase in their expression is observed in and associated with a variety of inflammatory diseases, including respiratory pathologies.

MMPs are expressed at low levels in normal adult tissues, and their up-regulation appears to play an important role in the development of a number of pathological processes including fibrosis. Further studies have demonstrated the involvement of MMPs in the pathogenesis of pulmonary and/or hepatic fibrosis. For example, BAL fluids from individuals with sarcoidosis (13) or pulmonary fibrosis (14) contain high levels of collagenase, thought to be neutrophil-derived, a fact that has been suggested to be related to the development of fibrosis in these subjects. Fukuda et al. (15) investigated MMPs activities in the lungs of patients with bronchiolitis obliterans organizing pneumonia and IPF. In bronchiolitis obliterans organizing pneumonia, predominant MMPs, mainly active MMP-2, may constitute the mechanisms of reversibility of fibrotic changes in this disease. Conversely, a TIMP-2 increase in IPF may contribute to the stable ECM deposition and the irreversible pulmonary structural remodeling. Hayashi et al. (16) have suggested the involvement of MMP-2 in collagen deposition in IPF. Moreover, Pardo et al. (17) reported that cultured fibroblasts derived from patients with IPF exhibited an increased MMPs/collagenase ratio. The involvement of MMP-2 in ECM deposition was also suggested in a model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rabbits (18). It has been recently suggested that in IPF there is a higher expression of TIMPs compared with collagenases, supporting the hypothesis that no degrading fibrillar collagen microenvironment is prevailing (1). Such observations have been confirmed *in vivo* in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis (19).

ECM changes in the liver depend upon ECM synthesis and MMP-mediated ECM proteolytic degradation. Healthy adult livers have a moderate ECM turnover, which seems to correlate with the relatively small amounts of MMPs constitutively detected in those livers (20). Hepatic injury is frequently categorized into acute and chronic liver injury and MMPs have been linked to a number of acute and chronic liver disorders (21).

Chronic inflammatory process in the liver is responsible of an excessive accumulation of ECM components including collagens, and proteoglycans, which are major players in the formation of transformed tissue. MMPs and TIMPs are also the main regulators of ECM turnover in hepatic fibrosis (22). Hepatic stellate cells, which express ECM components, MMPs and TIMPs in different timeframes are thought to play central roles in the development of hepatic fibrosis (20). MMP-1, MMP-8 and MMP-13 seem to be among the candidates for an anti-fibrotic role, since their overexpression has been associated to significantly reduced liver fibrosis and enhanced hepatocyte proliferation (23-25). MMP-13 up-regulation in the liver has been correlated with the change from normal to abnormal matrix turnover in the CCl<sub>4</sub> preclinical injury model (26).

Using the classical model of CCL-4-induced liver fibrosis in mice, we observed a significant increase for type I collagen  $\alpha$ 1 at 24 hours and three weeks associated with an increase in mRNA expression for MMP2 and a release of pro MMP-9 (figures 1 and 2). Moreover, MMP-13 gene deletion results in a retarded resolution of CCl<sub>4</sub>-induced fibrosis (27). MMP-9 expression has been detected in the early stages of hepatic fibrogenesis and it may release/activate TGF- $\beta$ , a major pro-fibrotic cytokine, from ECM reservoirs (28-30). Additionally, MMP-9 may promote hepatic stellate cell apoptosis in the presence of low levels of TIMP-1 (29).

### **3) Effect of inhibition of MMPs in inflammatory process and fibrosis**

TIMPs are specific endogenous inhibitors that bind to the active site of the MMPs in a stoichiometric 1:1 molar ratio, thereby blocking access to extracellular matrix substrates. Four TIMPs (TIMP-1, -2, -3 and -4) have been identified in vertebrates, and their expression is regulated during development, tissue remodelling but also inflammation (31). Given that MMPs degrade various components of the ECM, a tight regulation of MMP

activities is essential to prevent excessive matrix degradation. The primary action of TIMPs is to inhibit matrix metalloproteinases, but numerous studies have reported cell growth-promoting, anti-apoptotic, steroidogenic and antiangiogenic activities (reviewed in 32,33), which are in part independent of MMP inhibition. Since the main cellular sources of TIMP-1 are macrophages and fibroblasts, one can easily suggest that TIMP-1 is involved in tissue remodelling associated with the activation of macrophages in inflammatory process. Studies have demonstrated that monocytes secrete large quantities of basal levels of TIMP-1, but are unresponsive to LPS, whereas macrophages secrete lower basal levels of TIMP-1, and are upregulated by LPS (33). It has also been speculated that TIMP-1 may be involved in the modulation of inflammatory responses and may also function to stabilise matrix components deposited in the injured lung.

Indeed, we previously reported that TIMP-1 was markedly increased in mice's lungs, 24 hours after the administration of bleomycin at day 1 (34). During this period, we were not able to observe collagen deposition, but bleomycin induced an important inflammatory reaction characterized by an influx of neutrophils and probably an increase in macrophage activity. However, the depletion of mice in neutrophils did not modify the level of the TIMP-1 protein in comparison with control mice (34). We also reported that the non selective MMP inhibitor, batimastat reduced the development of bleomycin-induced fibrosis in mice associated with a decrease in TIMP-1 levels in BAL fluids (35). This strongly suggests that TIMP-1 may be considered as an available target for tissue remodelling and fibrosis.

Through the importance of ECM remodelling, there is a significant interest in using MMPs inhibition as a therapeutic strategy. However, the TIMPs have not proved to be suitable for pharmacological applications due to their short half-life *in vivo* (36). Numerous MMP inhibitors are still under development, in spite of extensive efforts by almost all major

pharmaceutical companies, indicating that the development of MMP inhibitors is very challenging (37). The first synthetic broad-spectrum MMP inhibitor includes hydroxamic acid derived inhibitors such as BB-94 (Batimastat), BB-1101, BB-2293, BB-2516 (marimastat), and CT1746. Batimastat and marimastat, are competitive MMP-inhibitors and Zn<sup>2+</sup>-chelating mimickers of collagen. Initial results have been promising in cancer research in blocking the progression of tumor growth (38,39). We have previously showed that batimastat significantly limits the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice associated with a reduction of levels of TIMP-1 (35).

Similarly to that reported for pulmonary fibrosis, there is growing evidence supporting a TIMP to degrade ECM in hepatic fibrosis (40). TIMP-1 and TIMP-2 are expressed in high levels in murine fibrotic livers after CCl<sub>4</sub> administration (41). We also clearly observed an increase in mRNA expression and production of TIMP-1. Moreover, treatment of fibrotic murine livers with modified synthetic siRNA targeting TIMP-2 reduces fibrosis by decreasing HSC activation and collagen accumulation (42). TIMP-1 over-expression may exacerbate liver fibrosis, and hepatic fibrosis may mediate fibrosis through the TIMP-1 dependent signaling pathway (43). The activated HSCs not only secrete excess type I collagen, but markedly increase TIMP expression, leading to a shift toward excess ECM synthesis and fibrogenesis (44). In support of the role of TIMP-1 *in vivo*, transgenic mice over-expressing human TIMP-1 showed deteriorated fibrosis in response to long-term CCl<sub>4</sub> administration (45). TIMP-1 is also a contributory factor in the development of hepatic fibrosis as shown in animal models and patients (46). Due to the inhibition of collagenase and others enzymes involved in the turn TIMP-1 alone may not induce liver fibrosis, but it can significantly exacerbate the hepatic fibrosis (47). Another study reports that transplantation of stem cells expressing TIMP-1-shRNA is able to inhibit the progression of liver fibrosis and possibly restore the liver function in a rat model (48).

These observations support the view that therapies aimed at overexpressing selective MMPs and reducing excessive TIMP levels may ameliorate fibrosis.

#### **4) Role of Inflammasome pathway in the development of fibrosis**

Several inflammatory diseases have been reported to be linked with the activation of inflammasome pathway including gout (49), Crohn's disease (50), rheumatoid arthritis (51) and cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) (52).

The best-characterized inflammasome consists of three main components, the Nod-like receptor (NLR)-family protein, NLRP3, pro-caspase-1 and the ASC (Apoptosis speck-like protein containing a CARD) adapter, which bridge interactions between the former proteins (53). NLRP3 activation requires two signals. Cell priming with an NF- $\kappa$ B activator, such as the TLR4-ligand LPS, is the first step of NLRP3 inflammasome activation leading to its own upregulation (54). The second signal includes a broad variety of activators, in which one the major pathway includes the P2X7 purinergic receptor. Extracellular ATP, release upon cell death, is sensed by this receptor to induce a potassium efflux and the recruitment of pannexin-1, a membrane pore that allows the delivery of extracellular pathogen-associated molecule patterns (PAMPs) and danger-associated molecule patterns (DAMPs) into the cytosol. NLRP3 is expressed by myeloid cells and is then upregulated and activated in response to the stimulation of macrophages with these PAMPs or DAMPs (55). NLRP3 interacts with ASC and pro-caspase-1 to become effective. Following autoactivation via inflammasome assembly, caspase-1 cleaves pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18, whose biologically active form IL-1 $\beta$  and IL-18 are then secreted.

IL-1 $\beta$  is a cytokine with major roles in inflammation, innate immune response and fibrosis. This cytokine is produced by activated monocytes, macrophages and dendritic cells, inducing the production of chemokines or cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-6, or

proteases such as matrix metalloproteinases (MMPs) associated with neutrophil recruitment and proliferation of resident cells mainly fibroblasts (56). Since mature IL-1 $\beta$  is very potent, its production is tightly regulated on expression, transcription and secretion (57).

It has also been previously demonstrated that pulmonary fibrosis is closely associated with the activation of NLRP3-inflammasome pathway, production of IL-1 $\beta$  and TIMP-1 (58, 59). Indeed, several studies using KO mice for several components of inflammasome pathway including NLRP3, ASC and caspase-1 showed a reduction of experimental pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice (58-60). In an alveolar basal epithelial cell line, IL-1 $\beta$  was shown to stimulate transcription of TGF- $\beta$  via an NF- $\kappa$ B and AP-1 pathway (61). The inhibition of the collagen deposition and fibrosis is well correlated with the imbalance between MMPs and TIMP-1 in favour to increase TIMP-1 production. Moreover, production of TIMP-1 and collagen deposition is reduced in IL-1 receptor and MyD88 deficient mice (56). Similarly, cigarette smoke-induced inflammation and elastase-induced emphysema in mice depends on inflammasome pathway and IL-1R1/MyD88 signaling (62, 63). Due to the fact that the IL-1R signals via a MyD88 domain, in common with most Toll receptors, and results in the up-regulation of pro-IL-1 $\beta$ , the release of IL-1 $\beta$  can initiate a positive feedback cycle with IL-1 $\beta$  contributing to its own production.

Abnormal cell activation may provide signal that alert the immune system to danger, triggering innate immunity activation leading to inflammatory process and remodelling. In this context, dying cells release danger signals that may activate the immune system and stimulate innate and adaptive immunity. The danger signals are recognized by membrane receptors such as TLRs (64) or cytosolic receptors such NLRP3-inflammasome (53). It was clearly demonstrated that uric acid is a danger signal activating NLRP3-inflammasome pathway in gout arthritis (49). Uric acid is a product of purine catabolism



which is produced from injured tissue in vivo after tumor chemotherapy leading to tumor lysis syndrom characterized by hyperuricemia (65). At high local concentration, uric acid precipitates and forms crystals that cause inflammation as observed in gout and activate the caspase-1, leading to the production of IL-1 $\beta$ . It has been demonstrated that uric acid locally produced in the lung upon bleomycin-induced DNA damage and degradation induced the activation of NLRP3-inflammasome pathway.

Adenosine triphosphate (ATP) has been described also as a danger signal activating NLRP3-inflammasome leading to the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  release in lung. Extracellular ATP was shown to play a major role to trigger synthesis and release of mature IL-1 $\beta$  after initial stimulation of macrophages by an inflammatory signal such as LPS (59). ATP is described as an agonist of purinergic P2 receptor predominantly expressed on immune cells (67) and is reported to be involved in the pathophysiology of LPS-induced lung injury, modulating airway inflammatory process and functional changes (68). ATP mainly activates the P2X7 purinergic receptor, leading to trigger ASC-caspase-1 complex in a NLRP3-dependent manner, leading to the production of IL-1 $\beta$ . Fibrotic patients have elevated ATP content in BALF in comparison with control individuals (59). It has been shown an early increase in ATP levels in BALF on bleomycin administration in mice. Modulation of ATP levels with the ATP-degrading enzyme apyrase greatly reduced bleomycin -induced inflammatory cell recruitment, lung IL-1 $\beta$ , and TIMP-1 production. P2X(7) receptor-deficient mice presented dramatically reduced lung inflammation, with reduced fibrosis markers such as lung collagen content, TIMP-1 and MMP-9 (59). This clearly proposed that ATP released from bleomycin-injured lung cells constitutes a major endogenous danger signal that engages the P2X(7) receptor/pannexin-1 axis, leading to IL-1 $\beta$  maturation and lung fibrosis. We recently showed that ATP $\gamma$ S and BzATP, two analogs of ATP are able to potentiate the release of IL-1 $\beta$  from human monocyte-derived

macrophages induced by low concentration of LPS (69). Our recent results demonstrate the involvement of purinergic receptors and the NLRP3-inflammasome pathway in the secretion of IL-1 $\beta$  by MSU-stimulated human macrophages (70). Our findings suggest that blockade of the NLRP3-inflammasome pathway or the purinergic receptors is a novel potential therapeutic approach to control the inflammatory process in several associated pathologies such as fibrosis.

IL-1 $\beta$  and inflammasome pathway have been reported to play an important role in chronic liver inflammation leading to fibrosis and cirrhosis (71). Our results showed a significant increase in NLRP3 but not of MyD88 at 24 hours and three weeks and in pannexin-1 at 3 weeks in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice (figure 3). In rats, IL-1Ra administration attenuated dimethylnitrosamin (DMN)-induced liver cirrhosis (72) and during experimental liver fibrosis induced by thioacetamide (TAA) administration, IL-1 levels are elevated, where they peak on day 1 followed by a peak in type I collagen on day 3. They also demonstrate the increase in  $\alpha$ -smooth muscle actin, indicating the myofibroblast differentiation, and there is significantly less liver fibrosis in IL-1R deficient mice (73). Moreover, the expression of MMP-9, MMP-13, and TIMPs, are dependent upon IL-1 activation (73); however, the exact mechanisms by which IL-1R signaling promotes fibrosis and the cell type(s) that produce(s) IL-1 $\beta$  remain elusive. Hepatic stellate cells expressed components of the inflammasome and activation of primary mouse stellate cells or LX-2 HSC cells with MSU resulted in increased TGF $\beta$  and collagen-1 expression, actin reorganization, and inhibition of HSC chemotaxis in an NLRP3-dependent manner (74). These changes did not occur if the HSC were lacking the inflammasome component ASC. In a carbon-tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) and TAA-induced *in vivo* liver fibrosis model, expression of TGF- $\beta$  and collagen-1 was significantly reduced in mice lacking either NLRP3 or the adaptor molecule ASC. Using NLRP3 KO mice, it was also reported that NLRP3

inflammasome activation is required for fibrosis development in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) (75).

Additional data from the CCl<sub>4</sub>-induced fibrosis model indicated that IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) protected mice from acute hepatocyte damage and promoted hepatocyte proliferation (76). IL-1Ra was also reported to improve inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice (77). In an animal model of NASH, inhibition of hepatic cell death with a pan-caspase inhibitor suppressed fibrosis (78). The specific role of caspase-1 versus other caspases is yet to be fully understood in liver fibrosis.

Purinergic signaling is also involved in the development of liver fibrosis (79). Using the CCl<sub>4</sub>-preclinical experimental model of experimental liver fibrosis, we observed a significant increase in mRNA for P2X1 receptor at 3 weeks and in P2X7 and P2Y6 receptors at 24 hours and three weeks (figure 4). The involvement of P2X7 is supported by the study showing that P2X7 receptor blockade attenuates mouse liver fibrosis (80). This is only in accordance with the fact that P2X7 receptor is involved in non alcoholic steatohepatitis (81).

## **5) Conclusions and future directions**

It has not yet been clearly established which MMP activity needs to be inhibited in order to have an impact on fibrosis associated with inflammatory process. Since numerous reported evidences suggest that different MMPs play an important role in the pathogenesis of tissue remodelling associated with inflammatory processes in several diseases, broad spectrum MMPs inhibitors may have therapeutic potential.

One alternative is a gene transfer to overexpress TIMPs which can reduce MMPs activity and modulate tissue remodelling. Several preclinical studies of various diseases have reported encouraging data. However, expressing wild-type TIMPs could have

drawbacks because multiple MMPs may be inhibited. The best route to success is probably the development of engineered TIMPs with altered specificity, to enable the targeting of specific MMPs. One alternative of selective MMP inhibitors could be the RNA interference therapy development.

The recent characterization of the involvement of the NLRP3-inflammasome pathway has opened a large possibility of new therapeutic targets for the reduction of collagen deposition and fibrosis. However, we need of selective and available tools to validate the right target. For instance, our goal is to investigate the role of purinergic receptors. Regarding the recent data, P2X7 receptor would be a good candidate. However, it is not excluded that blockade of one type of receptors may induce a compensation by others. The screening of potential drugs effective in preclinical models of fibrosis would be the next challenge.

## **Acknowledgements**

The authors thank CNPq for the grant of Pr. Vincent Lagente as a Special Visiting Researcher fellowship (PVE) at the Federal University of Rio de Janeiro under the Brazilian Scientific Mobility Program "Ciências sem Fronteiras", (Process number: 303452/2014-5) and the grant of Pr. Emiliano Barreto as External Post-Doctoral position (PDE) at the University of Rennes 1 under the Brazilian Scientific Mobility Program "Ciências sem Fronteiras", (Process number: 203537/2014-9). This study is supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) project (ANR2010 MIDI01202) and INSERM.

## **Declarations of interest**

The authors have no financial conflicts of interest.

## References

1. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *An Int Med.* 2001, 134: 136-151.
2. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998, 157: 1301-1315.
3. Ward PA, Hunninghake GW. Lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998, 157: S123-S129.
4. Kolb M, Bonniaud P, Galt T et al. Differences in the fibrogenic response after transfer of active transforming growth factor-beta1 gene to lungs of "fibrosis-prone" and "fibrosis-resistant" mouse strains. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002, 27: 141-150.
5. Gauldie J, Kolb M, Sime PJ. A new direction in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis? *Respir Res.* 2002, 3: 1.
6. Santana A, Saxena B, Noble NA et al. Increased expression of transforming growth factor beta isoforms (beta 1, beta 2, beta 3) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995; 13: 34-44.
7. Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S et al. Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Pathol.* 1997, 150: 981-991.

8. Poynard, T., Mathurin, P., Lai, C.L., Guyader, D., Poupon, R., Tainturier, M.H., Myers, R.P., Muntenau, M., Ratziu, V., Manns, M. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol.* 2003, 38 : 257-265
9. Friedman, S.L. Liver fibrosis - from bench to bedside. *J. Hepatol.* 2003, 38: 38-53.
10. Fattovich, G., Giustina, G., Degos, F., Tremolada, F., Diodati, G., Almasio, P., Nevens, F., Solinas, A., Mura, D., Brouwer, J.T. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology.* 1997, 112 : 463-472.
11. Vu T, Werb Z. Gelatinase B: structure, regulation, and function. In "Matrix Metalloproteinases". 1998, W. C. Parks and R. P. Mecham, editors. Academic Press, San Diego. 115–148.
12. Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16: 558–564.
13. O'Connor C, Odlum C, Van Breda A et al. Collagenase and fibronectin in bronchoalveolar lavage fluid in patients with sarcoidosis. *Thorax* 1998, 43: 393-400.
14. Gadeck JE, Kelman JA, Fens GA et al. Collagenase in the lower respiratory tract of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *New Eng J Med.* 1979, 301: 737-742.
15. Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S et al. Localisation of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest.* 1998, 78: 687-698.
16. Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MY et al. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 1996, 149: 1241-1256.

17. Pardo A, Selman M, Ramirez R et al. Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by fibroblasts derived from normal and fibrotic human lung. *Chest*. 1992, 102: 1085-1089.
18. Yaguchi T, Fukuda Y, Ishizaki M et al. Immunohistochemical and gelatin zymography studies for matrix metalloproteinases in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Pathol Int*. 1998, 48: 954-963.
19. Madtes DK, Elston AL, Kaback LA et al. Selective induction of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001, 24: 599-607.
20. Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001, 21: 373–384
21. Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol*. 2015, 44-46: 147-56.
22. Han YP. Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006, 21 (Suppl. 3): S88–S91.
23. Harty MW, Huddleston HM, Papa EF, Puthawala T, Tracy AP, Ramm GA, et al. Repair after cholestatic liver injury correlates with neutrophil infiltration and matrix metalloproteinase 8 activity *Surgery*. 2005, 138: 313–320
24. Limuro Y, Nishio T, Morimoto T, Nitta T, Stefanovic B, Choi SK et al. Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. *Gastroenterol*. 2003, 124: 445–458
25. Endo H, Niioka M, Sugioka M, Itoh J, Kameyama K, Okazaki I et al. Matrix metalloproteinase-13 promotes recovery from experimental liver cirrhosis in rats. *Pathobiol*. 2011, 78: 239–252



26. Calabro SR, Maczurek AE, Morgan AJ, Tu T, Wen VW, Yee C, et al. Hepatocyte produced matrix metalloproteinases are regulated by CD147 in liver fibrogenesis. *PLoS One*. 2014, 9: e90571
27. Fallowfield JE, Mizuno M, Kendall TJ, Constandinou CM, Benyon RC, Duffield JS et al. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol*. 2007, 178: 5288–5295
28. Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol*. 2000, 113: 443–453
29. Ramachandran P, Iredale JP. Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution. *QJM*. 2012, 105: 813–817
30. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis *Genes Dev*. 2000, 14: 163–176
31. Brew K. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000, 1477: 267–283.
32. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003, 92: 827–839
33. Wong S, Belvisi MG, Birrell MA. Profiling of MMP/TIMP gene expression in human and rodent lung samples, and in models of airway inflammation. *Proc Am Thor Soc*. 2005, 2: A73.
34. Manoury B, Nenan S, Guénon I, Lagente V, Boichot E. Influence of early neutrophil depletion on MMPs/TIMP-1 balance in bleomycin-induced lung fibrosis. *Int*

- Immunopharmacol. 2007, 7: 900-911.
35. Corbel M, Caulet-Maugendre S, Germain N, Lagente V, Boichot E. Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the matrix metalloproteinase inhibitor, batimastat. *J Pathol.* 2001, 193: 538-545.
36. Skiles JW, Gonnella NC, Jeng AY. The design, structure, and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Med Chem.* 2001, 8: 425-474.
37. Skotnicki JS, Levin JI, Killar LM. Matrix metalloproteinase inhibitors. In "Metalloproteinases as targets for anti-inflammatory drugs" *Progress in Inflammation Research* ed by Bottomley KMK, Bradshaw D, Nixon JS, 1999, pp17-57
38. Wang X, Fu X, Brown PD, Crimmin MJ, Hoffman RM. Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. *Cancer Res.* 1994, 54: 4726–4728.
39. Watson SA, Morris TM, Collins HM, Bawden LJ, Hawkins K, Bone EA. Inhibition of tumour growth by marimastat in a human xenograft model of gastric cancer: relationship with levels of circulating CEA. *Br J Cancer.* 1999, 81: 19-23
40. J.P. Iredale, A. Thompson, N.C. Henderson Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: biochemistry and regulation. *Biochim Biophys Acta.* 2013 1832: 876–883
41. Roeb E, Purucker E, Breuer B, Nguyen H, Heinrich PC, Rose-John S et al. TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat *J Hepatol.* 1997, 27: 535–544
42. Hu Y, Li DG, Lu HM. Modified synthetic siRNA targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits hepatic fibrogenesis in rats *J Gene Med.* 2007, 9: 217–229
43. Wang K, Lin B, Brems JJ, Gamelli RL. Hepatic apoptosis can modulate liver fibrosis

- through TIMP1 pathway. *Apoptosis*. 2013, 18: 566–577.
44. Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis*. 2005, 10: 927–939.
45. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology*. 2002, 36: 850–860.
46. Iredale J. Defining therapeutic targets for liver fibrosis: exploiting the biology of inflammation and repair. *Pharmacol Res*. 2008, 58: 129–136.
47. Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez DE, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Thorgeirsson SS, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology*. 2000, 32: 1248–1254.
48. Zhu Y, Miao Z, Gong L, Chen W. Transplantation of mesenchymal stem cells expressing TIMP-1-shRNA improves hepatic fibrosis in CCl<sub>4</sub>-treated rats. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015, 8(8): 8912–8920.
49. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome, *Nature*. 2006, 440: 237-241.
50. Villani AC, Lemire M, Fortin G, Louis E, Silverberg MS, Collette C, Baba N, Libioulle C, Belaiche J, Bitton A, Gaudet D, Cohen A, Langelier D, Fortin PR, Wither JE, Sarfati M, Rutgeerts P, Rioux JD, Vermeire S, Hudson TJ, Franchimont D, Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility, *Nature Genetics*. 2009, 41: 71-76.

51. Rosengren HM, Hoffman W, Bugbee B, Boyle DL, Expression and regulation of cryopyrin and related proteins in rheumatoid arthritis synovium, *An Rheumatic Dis.* 2005, 64: 708-714.
52. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J, NALP3 Forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder, *Immunity.* 2004, 20: 319-325.
53. Martinon F, Burns K and Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta, *Mol Cell.* 2002, 10: 417-426.
54. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* 2009, 183: 787-791
55. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG, Chen G, Park JH, Franchi L, Vandenabeele P, Núñez G. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity.* 2007, 26: 433-443.
56. Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulain N, Charron S, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Akira S, Quesniaux VF, Lagente V, Ryffel B and Couillin I, IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest.* 2007, 117: 3786-3799.
57. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body, *Ann Rev Immunol.* 2009, 27: 229-265.
58. Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Pétrilli V, Tschopp J, Lagente V,

- Quesniaux VF, Ryffel B and Couillin I, Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis, *Am J Resp Crit Care Med.* 2009, 179: 903-913.
59. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux VF, Marchand-Adam S, Crestani B, Ryffel B and Couillin I, Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010, 182: 774-783.
60. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee MP, Weinrauch Y, Monack DM and Dixit VM, Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006, 440: 228–232.
61. Lee KY<sup>1</sup>, Ito K, Hayashi R, Jazrawi EP, Barnes PJ, Adcock IM. NF-kappaB and activator protein 1 response elements and the role of histone modifications in IL-1beta-induced TGF-beta1 gene transcription. *J Immunol.* 2006 Jan 1;176(1):603-15.
62. Doz E, Noulin N, Boichot E, Guénon I, Fick L, Le Bert M, Lagente V, Ryffel B, Schnyder B, Quesniaux VF, Couillin I. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J Immunol.* 2008, 180: 1169-1178.
63. Couillin I, Vasseur V, Charron S, Gasse P, Tavernier M, Guillet J, Lagente V, Fick L, Jacobs M, Coelho FR, Moser R, Ryffel B. IL-1R1/MyD88 signaling is critical for elastase-induced lung inflammation and emphysema. *J Immunol.* 2009, 183: 8195-8202.
64. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ. Toll-

- like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol.* 2007, 8: 487-496.
65. Cammalleri L, Malaguarnera M. Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia in tumor lysis syndrome and in gout. *Int J Med Sci.* 2007, 4: 83-93.
66. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F. The P2X7 receptor: A key player in IL-1 processing and release, *J Immunol.* 2006, 176: 3877–3883.
67. Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP and Stojilkovic SS, Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels, *Pharmacol Rev.* 2011, 63: 641-683.
68. Monção-Ribeiro LC, Cagido VR, Lima-Murad G, Santana PT, Riva DR, Borojevic R, Zin WA, Cavalcante MC, Riça I, Brando-Lima M, Takiya CM, Faffe DS, Coutinho-Silva R, Lipopolysaccharide-induced lung injury: role of P2X7 receptor. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011, 179: 314-325.
69. Gicquel T, Victoni T, Fautrel A, Robert S, Gleonnec F, Guezingar M, Couillin I, Catros V, Boichot E, Lagente V. Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2014, 41: 279-286.
70. Gicquel T, Robert S, Loyer P, Victoni T, Bodin A, Ribault C, Gleonnec F, Couillin I, Boichot E, Lagente V. IL-1 $\beta$  production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *FASEB J.* 2015, 29: 4162-4173.
71. Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases. *J Hepatol.* 2012, 57: 642-654.
72. Mancini R, Benedetti A, Jezequel AM. An interleukin-1 receptor antagonist decreases fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rat liver. *Virchows Arch.* 1994,

424: 25–31.

73. Gieling G, Wallace K, Han YP. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009, 296: G1324–G1331.
74. Watanabe A, Sohail M, Gomes DA, Hashmi A, Nagata J, Sutterwala FH et al. Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009, 296: G1248–G1257
75. Wree A, McGeough MD, Peña CA, Schlattjan M, Li H, Inzaugarat ME, Messer K, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J Mol Med (Berl)*. 2014, 92: 1069-1082.
76. Zhu R, Xiang D, Xie X, Li JJ, Hu JJ, He HL et al. Protective effect of recombinant human IL-1Ra on CCl4-induced acute liver injury in mice. *World J Gastroenterol*. 2010, 16: 2771–2779.
77. Petrasek J, Bala S, Csak T, Lippai D, Kodys K, Menashy V, Barrieau M, Min SY, Kurt-Jones EA, Szabo G. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J Clin Invest*. 2012, 122: 3476-3489.
78. Witek RP, Stone WC, Karaca FG, Syn WK, Pereira TA, Agboola KM et al. Pan-Caspase inhibitor VX-166 reduces fibrosis in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis *Hepatology*. 2009, 50: 1421–1430
79. Lu D, Insel PA. Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 6. Purinergic signaling and response in fibroblasts and tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014, 306: C779–C788.
80. Huang C, Yu W, Cui H, Wang Y, Zhang L, Han F, Huang T. P2X7 blockade attenuates mouse liver fibrosis. *Mol Med Rep*. 2014 Jan;9(1):57-62.

81. Chatterjee S, Das S. P2X7 Receptor as a Key Player in Oxidative Stress-Driven Cell Fate in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Oxid Med Cell Longev*. 2015, 2015: 172493.



## Legends for figures

Figure 1 - mRNA expression for MMP-2, TIMP-1 and  $\alpha$ 1-collagen, 24 h after treatment with the CCl<sub>4</sub> (1 IP injection; 0.35 mL/kg) or after 3 weeks of treatment to the CCl<sub>4</sub> (6 IP injections; 0.35 mL/kg) in C57Bl/6J mice compared with controls (vehicle), ( $m \pm SEM$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.001$ ).

Figure 2 – Production of IL-1beta, Pro-MMP-9 and TIMP-1, 24 h after treatment with the CCl<sub>4</sub> (1 IP injection; 0.35 mL/kg) or after 3 weeks of treatment to the CCl<sub>4</sub> (6 IP injections; 0.35 mL/kg) in C57Bl/6J mice compared with controls (vehicle), ( $m \pm SEM$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.001$ ).

Figure 3 – mRNA expression for pannexin-1, NLRP3 and MyD88, 24 h after treatment with CCl<sub>4</sub> (1 IP injection; 0.35 mL/kg) or after 3 weeks of treatment to the CCl<sub>4</sub> (6 IP injections; 0.35 mL/kg) in C57Bl/6J mice in comparison with controls (vehicle), ( $m \pm SEM$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.001$ ).

Figure 4 – mRNA expression for purinergic receptors P2X1, P2X7 and P2Y6, 24 h after treatment with the CCl<sub>4</sub> (1 IP injection; 0.35 mL/kg) or after 3 weeks of treatment to the CCl<sub>4</sub> (6 IP injections; 0.35 mL/kg) in mice C57Bl/6J in comparison with controls (vehicle), by q - PCR technique ( $m \pm SEM$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.001$ ).

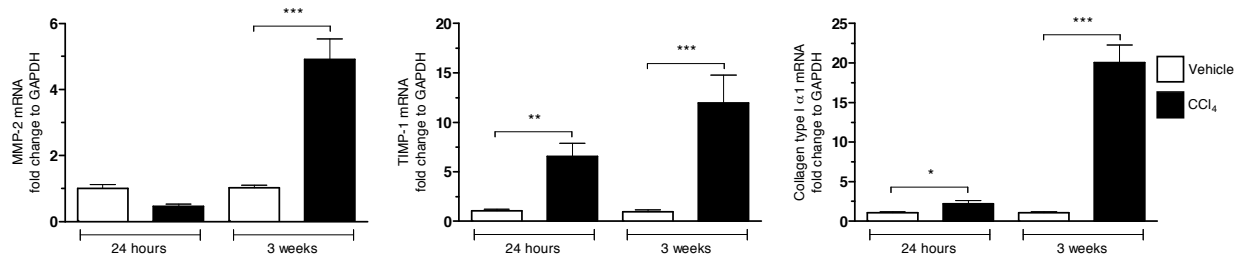


Figure 1 - mRNA expression for MMP-2, TIMP-1 and  $\alpha$ 1-collagen, 24 h after treatment with the CCl<sub>4</sub> (1 IP injection; 0.35 mL/kg) or after 3 weeks of treatment to the CCl<sub>4</sub> (6 IP injections; 0.35 mL/kg) in C57Bl/6J mice compared with controls (vehicle), ( $m \pm SEM$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.001$ ).

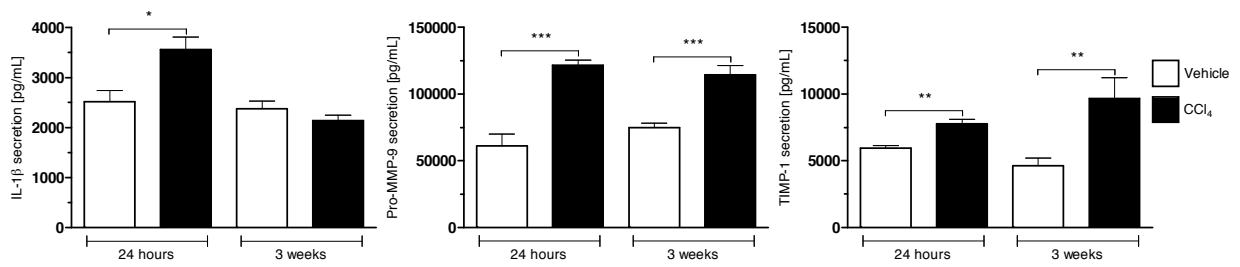


Figure 2 – Production of IL-1beta, Pro-MMP-9 and TIMP-1, 24 h after treatment with the CCl<sub>4</sub> (1 IP injection; 0.35 mL/kg) or after 3 weeks of treatment to the CCl<sub>4</sub> (6 IP injections; 0.35 mL/kg) in C57Bl/6J mice compared with controls (vehicle), ( $m \pm SEM$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.001$ ).

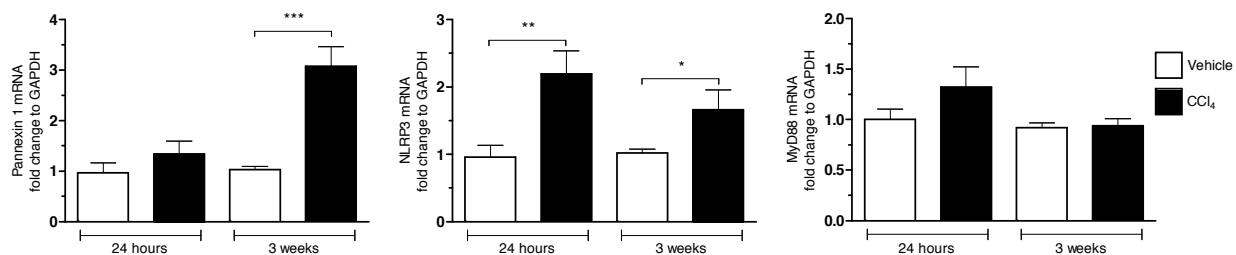


Figure 3 – mRNA expression for pannexin-1, NLRP3 and MyD88, 24 h after treatment with CCl<sub>4</sub> (1 IP injection; 0.35 mL/kg) or after 3 weeks of treatment to the CCl<sub>4</sub> (6 IP injections; 0.35 mL/kg) in C57Bl/6J mice in comparison with controls (vehicle), ( $m \pm SEM$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.001$ ).

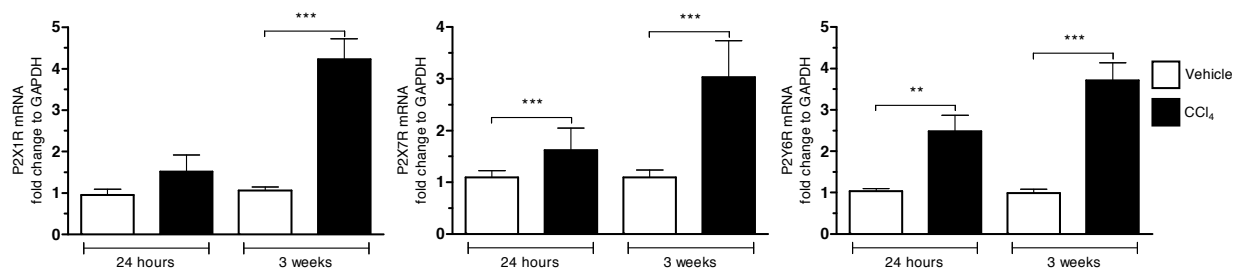
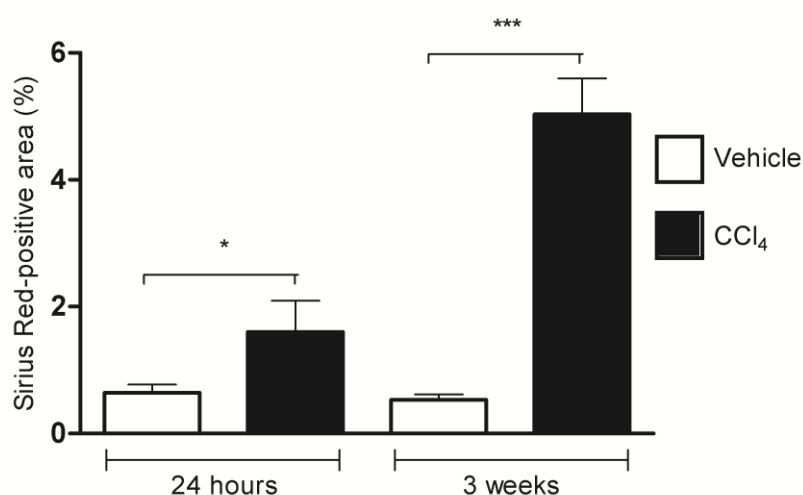


Figure 4 – mRNA expression for purinergic receptors P2X1, P2X7 and P2Y6, 24 h after treatment with the CCl<sub>4</sub> (1 IP injection; 0.35 mL/kg) or after 3 weeks of treatment to the CCl<sub>4</sub> (6 IP injections; 0.35 mL/kg) in mice C57Bl/6J in comparison with controls (vehicle), by q - PCR technique (m ± SEM; \*: p < 0,05; \*\*: p < 0.01; \*\*\*\*: p < 0.001).

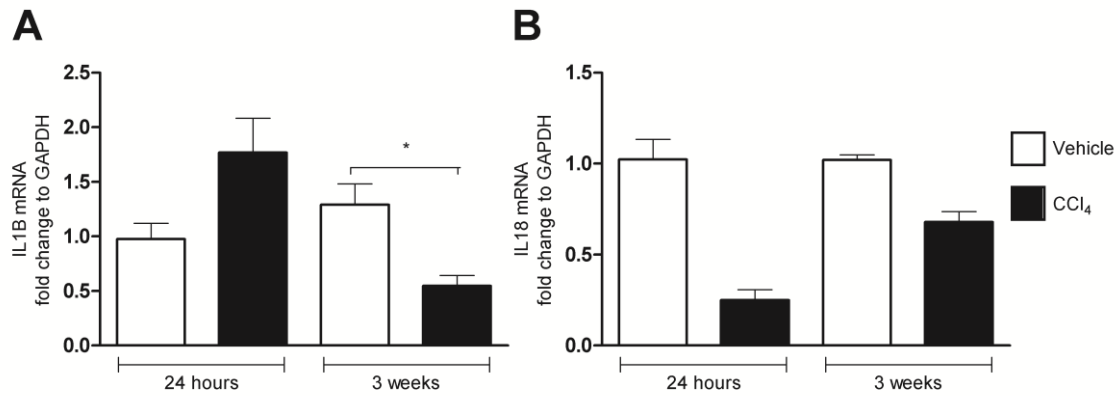
#### 4- Résultats complémentaires

Nous avons vérifié le niveau de fibrose hépatique à l'aide d'une coloration au rouge Sirius qui marque les fibres de collagène déposées dans le tissu hépatique. En accord avec les résultats d'expression des ARNm du collagène de type I, et d'autres marqueurs fibrotiques comme la MMP-2 et le TIMP-1, nous pouvons observer une augmentation significative du dépôt de collagène dès 24 heures et encore plus importante à 3 semaines de traitement par le CCl<sub>4</sub> (**Figure 12**).



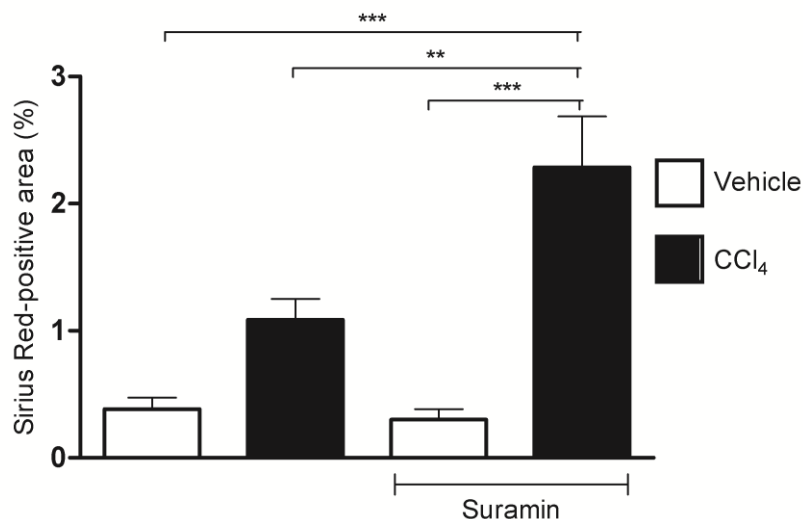
**Figure 12 - Analyse du dépôt de collagène dans les tissus de souris sauvages traitées au CCl<sub>4</sub> en aigu ou chronique.** Les souris *wild-type* C57Bl/6JRj ont été traitées par 0,35 mL/kg de CCl<sub>4</sub> ou le véhicule (huile de tournesol) par une injection IP pendant 24 heures avant d'être euthanasiées, ou bien par des injections en IP répétées 2 fois par semaine pendant 3 semaines avant d'être euthanasiées. Après fixation des foies et coupes histologiques au microtome, la coloration au rouge Sirius est effectuée et les zones positives au rouge Sirius sont quantifiées en pourcentage par rapport à la superficie totale des coupes observées. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Dans ce modèle, nous avons détecté une augmentation des taux circulants d'IL-1 $\beta$  très rapidement après l'administration de CCl<sub>4</sub> (24 heures) mais pas après 3 semaines de traitement. Nous avons réalisé une RT-qPCR afin de mesurer l'expression des gènes codants pour les deux cytokines libérées par l'activation de l'inflammasome. Nous avons observé que les souris traitées pendant 3 semaines présentent des niveaux d'expression réduits du gène codant pour l'IL-1 $\beta$ , sans modification de celui codant pour l'IL-18, suggérant que l'inflammasome n'est pas activé dans ce modèle expérimental (**Figure 13**).



**Figure 13 - Analyse de l'expression de l'ARNm de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 dans les tissus de souris sauvages traitées au CCl<sub>4</sub> en aigu ou chronique.** Les souris *wild-type* C57Bl/6JRj ont été traitées par 0,35 mL/kg de CCl<sub>4</sub> ou le véhicule (huile de tournesol) par une injection IP pendant 24 heures avant d'être euthanasiées, ou bien par des injections en IP répétées 2 fois par semaine pendant 3 semaines avant d'être euthanasiées. L'expression de l'IL-1 $\beta$  (A) et de l'IL-18 (B) est normalisée par rapport à celui de la GAPDH. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$

Nous avons observé dans ce modèle une augmentation de l'expression de récepteurs purinergiques (P2X1, P2X7 et P2Y6), suggérant que l'ATP extracellulaire libéré par la nécrose des hépatocytes en réponse au CCl<sub>4</sub> est un élément primordial au développement de la fibrose, suggérant l'implication de l'inflammasome dont l'ATP fait office de second signal activateur, notamment via le récepteur P2X7 (Bours et al., 2011). Ainsi, nous avons traité les souris pendant 3 semaines, à raison de 5 jours par semaine, en parallèle des traitements au CCl<sub>4</sub>, avec de la suramine, un antagoniste non-sélectif des récepteurs purinergiques, à 20 mg/kg par voie IP. Nous avons observé une faible augmentation du dépôt de collagène chez les souris traitées au CCl<sub>4</sub> par rapport aux souris témoins. En revanche, une augmentation significative du dépôt de collagène est observée chez les souris traitées à la suramine avant l'induction de fibrose hépatique par le CCl<sub>4</sub> par rapport aux souris traitées à la suramine seule (**Figure 14**).

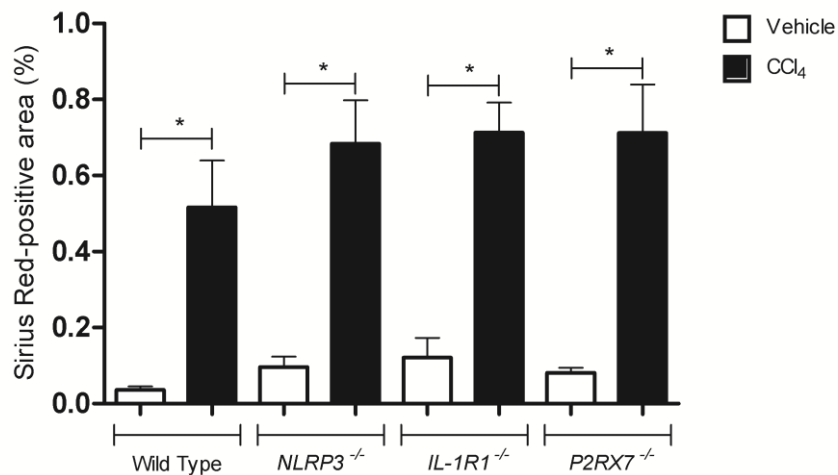


**Figure 14 - Comparaison du dépôt de collagène dans les tissus de foies de souris traitées ou non à la suramine, dans le modèle d'induction de fibrose hépatique au CCl<sub>4</sub>.** Les souris *wild-type* C57Bl/6JRj ont été traitées par 0,35 mL/kg de CCl<sub>4</sub> ou le véhicule (huile de tournesol) en injection IP pendant 3 semaines, à raison de 2 fois par semaine. En parallèle, les souris reçoivent 5 injections en IP par semaine de suramine à 20 mg/kg ou du NaCl 0,9%, avant d'être euthanasiées. Après fixation des foies et coupes histologiques au microtome, une coloration au rouge Sirius est effectuée et les zones positives au rouge Sirius sont quantifiées en pourcentage de la superficie totale des coupes observées. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Cette augmentation du niveau de fibrose hépatique est surprenante et remet en cause le couplage des récepteurs purinergiques à l'inflammasome dans la fibrose hépatique. Il est également possible que la suramine puisse inhiber une ou plusieurs voies de signalisation responsables de la protection de l'organe contre les lésions hépatotoxiques induites par le CCl<sub>4</sub>.

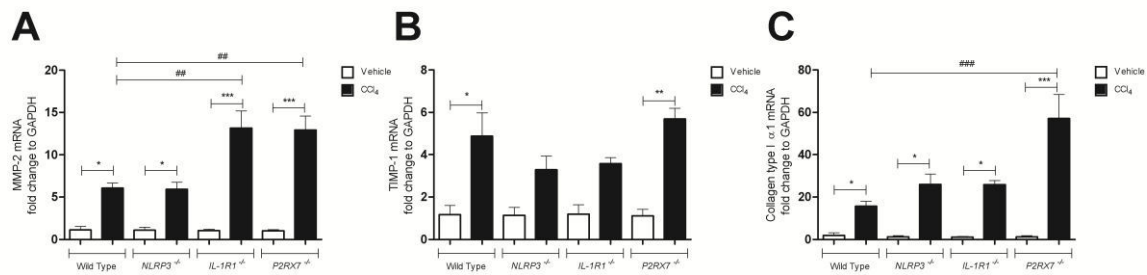
Nous avons par la suite observé les effets de la déficience génétique de NLRP3, P2RX7 et IL-1R1 sur la progression de la fibrose hépatique induite par le CCl<sub>4</sub>. Nous n'avons cependant pas observé de diminution des niveaux de dépôt de collagène dans les tissus des souris *knockout* par rapport aux souris sauvages, suggérant que l'inflammasome-NLRP3 et la voie de signalisation de l'IL-1 $\beta$  ne sont pas impliqués dans ce modèle d'étude (**Figure 15**).





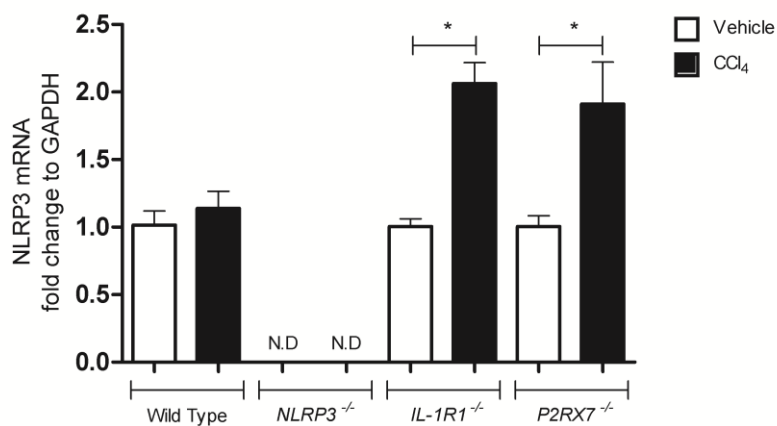
**Figure 15 - Comparaison du dépôt de collagène entre les tissus de foies de souris sauvage ou déficientes pour NLRP3, IL-1R1, ou P2RX7, dans le modèle d'induction de fibrose hépatique au CCl<sub>4</sub>.** Les souris *wild-type* C57Bl/6JRj, ou *knockout* pour l'expression de NLRP3 (*NLRP3*<sup>-/-</sup>), IL-1R1 (*IL-1R1*<sup>-/-</sup>), et P2RX7 (*P2RX7*<sup>-/-</sup>) ont été traitées par 0,35 mL/kg de CCl<sub>4</sub> ou de véhicule (huile de tournesol) en injection IP pendant 3 semaines, à raison de 2 fois par semaine, avant d'être euthanasiées. Après fixation des foies et coupes histologiques au microtome, une coloration au rouge Sirius est effectuée et les zones positives au rouge Sirius sont quantifiées en pourcentage de la superficie totale des coupes observées. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. \* p < 0,05.

Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de l'expression de gènes marqueurs pro-fibrotiques identifiés dans notre modèle expérimental, la MMP-2, le TIMP-1, et le collagène de type I α1 (**Figure 16**).



**Figure 16 - Analyse de l'expression de l'ARNm de la MMP-2, du TIMP-1 et du collagène de type I dans les tissus de foies de souris sauvage ou déficientes pour NLRP3, IL-1R1, ou P2RX7, dans le modèle d'induction de fibrose hépatique au CCl<sub>4</sub>.** Les souris *wild-type* C57Bl/6JRj ou bien *knockout* pour l'expression de NLRP3 (*NLRP3<sup>-/-</sup>*), IL-1R1 (*IL-1R1<sup>-/-</sup>*), et P2RX7 (*P2RX7<sup>-/-</sup>*) ont été traitées par 0,35 mL/kg de CCl<sub>4</sub> ou le véhicule (huile de tournesol) en injection IP pendant 3 semaines, à raison de 2 fois par semaine, avant d'être euthanasiées. L'expression de la MMP-2 (A), du TIMP-1 (B), et du collagène de type I α1 (C) est normalisée par rapport à celui de la GAPDH. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001 par comparaison au groupe de souris contrôles (vehicle). ## p < 0,01 ; ### p < 0,001 par comparaison au groupe de souris *wild-type* traitées au CCl<sub>4</sub>.

Nous avons observé une augmentation de l'expression du gène NLRP3 chez les souris sauvages après 24 heures ou 3 semaines de traitement avec le CCl<sub>4</sub>. Nous avons voulu voir les variations de l'expression de ce gène chez les souris *knockout*. A la différence de l'expérience précédente, l'augmentation significative de ce gène n'a pas été détectée dans cette expérience, en revanche les souris déficientes en P2RX7 et IL-1R1 montrent une augmentation significative de l'expression du gène NLRP3 en présence de CCl<sub>4</sub>. Comme attendu, l'expression de ce gène ne pouvait pas être détectée chez les souris qui en étaient déficientes (**Figure 17**).



**Figure 17 - Analyse de l'expression de l'ARNm de NLRP3 dans les tissus de foies de souris sauvage ou déficientes pour NLRP3, IL-1R1, ou P2RX7, dans le modèle d'induction de fibrose hépatique au CCl<sub>4</sub>.** Les souris *wild-type* C57Bl/6JRj ou bien *knockout* pour l'expression de NLRP3 (*NLRP3*<sup>-/-</sup>), IL-1R1 (*IL-1R1*<sup>-/-</sup>), et P2RX7 (*P2RX7*<sup>-/-</sup>) ont été traitées par 0,35 mL/kg de CCl<sub>4</sub> ou de véhicule (huile de tournesol) en injection IP pendant 3 semaines, à raison de 2 fois par semaine, avant d'être euthanasiées. L'expression de NLRP3 est normalisée par rapport à celui de la GAPDH. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. \* p < 0,05.

## **5- Conclusion**

Nous avons pu montrer une activation de la voie de l'inflammasome-NLRP3 dans un modèle de fibrose hépatique expérimentale induite par l'administration de CCl<sub>4</sub> pendant 3 semaines chez des souris C57Bl/6J. Cependant, ni l'antagonisme des récepteurs P2X et P2Y par la suramine, ni la déficience du récepteur P2X7, du récepteur à l'IL-1, ou de la protéine NLRP3, n'ont permis de réduire le développement de la fibrose hépatique dans notre modèle. Ces résultats suggèrent que l'activation de l'inflammasome-NLRP3 et l'effet de l'IL-1 $\beta$  ne sont pas intégrés à la voie principale du développement de la fibrose hépatique dans ce modèle expérimental.



## **Chapitre II : Effets de la stimulation inflammatoire directe de diverses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires sur l'activité des HSC, en comparaison aux effets anti-inflammatoires et pro-fibrotiques du TGF- $\beta$ 1**

### **1- Contexte scientifique**

Les HSC et les fibroblastes portaux sont considérés comme la première source des composants de la MEC lors de la fibrogénèse du foie (Mallat and Lotersztajn, 2013). Cependant, l'activation des CEF peut également favoriser la régression de la fibrose par l'intermédiaire de l'action des protéases de la MEC. Lors de la fibrogénèse, les dommages des cellules parenchymateuses et la réponse inflammatoire qui en résulte génère un large panel de signaux induisant l'activation de facteurs de transcription et de morphogènes par les CEF quiescentes, leur conférant ainsi des propriétés à la fois fibrogéniques et inflammatoires (Puche et al., 2013). Les CEF eux-mêmes sont la source de production de cytokines et de chimiokines inflammatoires, permettant le recrutement de nouvelles cellules immunitaires aggravant l'inflammation, les dommages et donc la fibrose hépatique (Pinzani and Marra, 2001; Schwabe et al., 2003; Seki et al., 2009a, 2009b).

Ainsi nous avons voulu étudier les stimuli inflammatoires capables d'activer les CEF *in vitro* afin de proposer des stratégies anti-fibrotiques sur la base de l'utilisation d'anti-inflammatoires adaptés. Nous avons choisi la lignée cellulaire LX-2 de CEF humain car elle présente le même profil d'activation que les CEF primaires activées/transdifférenciées (Xu et al., 2005), tout en s'abstrayant de la difficulté d'obtenir ces derniers.

Nous avons traité ces cellules avec des protéines recombinantes humaines de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-8, le TNF- $\alpha$  et le TGF- $\beta$ 1, puis nous avons étudié la réponse des cellules LX-2 vis-à-vis de l'expression de la balance MMP et TIMP, processus important de la fibrogénèse, de l'expression de marqueurs d'activation myofibroblastique et pro-fibrotique, tels que le PDGF-BB, les collagènes et l'endothéline-1, ainsi que l'expression de cytokines et de chimiokines inflammatoires.

Article 1 : « *Characterization of the MMP/TIMP imbalance and collagen production induced by IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  release from human hepatic stellate cells* »

## 2- Résumé des principaux résultats

Nous montrons dans ces travaux que le TGF- $\beta$ 1 est capable d'induire un profil profibrogénique et anti-inflammatoire dans les cellules LX-2 par la diminution de l'expression des gènes de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-8, le CXCL1, la MMP-1, la MMP-3, et l'augmentation de l'expression de la MMP-2 et du TIMP-1, de l'IL-6 et dans une moindre mesure du CCL2, ainsi que du collagène de type I et IV sous-unité  $\alpha$ 1, de l' $\alpha$ -SMA, de l'endothéline-1 et du PDGF-BB. Nous avons également observé que l'augmentation de l'IL-6 semble ne pas avoir d'impact sur la régulation de l'expression de ces gènes. Les traitements par l'IL-1 $\beta$  et  $\alpha$ , l'IL-8 et le TNF- $\alpha$  induisent tous l'augmentation de l'expression des gènes codant pour les MMP-1, MMP-3 et MMP-9, avec également une corrélation de l'activité de la MMP-9 avec l'IL-1 $\beta$ , suggérant que les niveaux d'expression du TIMP-1 dans les cellules LX-2 sont insuffisants pour atténuer ses effets fibrolytiques. Ces mêmes médiateurs induisent tous un profil pro-inflammatoire dans les cellules LX-2 avec l'augmentation de l'expression des gènes codants pour l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8, le CXCL1 et le CCL2. Nous avons également observé que l'IL-1 montre le plus fort effet anti-fibrotique dans les cellules LX-2 en induisant la diminution de l'expression de l'ARNm du collagène de type IV, de l' $\alpha$ -SMA, de l'endothéline-1 et du PDGF-BB, tandis que le TNF- $\alpha$  n'induit que celle de l' $\alpha$ -SMA, et l'IL-8 celle du PDGF-BB et de l' $\alpha$ -SMA. Cependant les niveaux de sécrétion de collagène de type I, la forme majoritairement induite lors de la fibrogénèse, sont inchangés par ces cytokines ou chimiokines. Nous avons également pu voir que l'infliximab et l'anakinra réduisent fortement les effets respectifs du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ .

RESEARCH ARTICLE

# Characterization of the MMP/TIMP Imbalance and Collagen Production Induced by IL-1 $\beta$ or TNF- $\alpha$ Release from Human Hepatic Stellate Cells

Sacha Robert\*, Thomas Gicquel, Aude Bodin, Vincent Lagente, Elisabeth Boichot

UMR991 INSERM, Université de Rennes 1, Rennes, France

\* [sacharobert35@gmail.com](mailto:sacharobert35@gmail.com)



CrossMark  
click for updates

OPEN ACCESS

**Citation:** Robert S, Gicquel T, Bodin A, Lagente V, Boichot E (2016) Characterization of the MMP/TIMP Imbalance and Collagen Production Induced by IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  Release from Human Hepatic Stellate Cells. PLoS ONE 11(4): e0153118. doi:10.1371/journal.pone.0153118

**Editor:** Matias A Avila, University of Navarra School of Medicine and Center for Applied Medical Research (CIMA), SPAIN

**Received:** January 21, 2016

**Accepted:** March 23, 2016

**Published:** April 5, 2016

**Copyright:** © 2016 Robert et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The authors have no support or funding to report.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Inflammation has an important role in the development of liver fibrosis in general and the activation of hepatic stellate cells (HSCs) in particular. It is known that HSCs are themselves able to produce cytokines and chemokines, and that this production may be a key event in the initiation of fibrogenesis. However, the direct involvement of cytokines and chemokines in HSC (self-)activation remains uncertain. In this study, the effects of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\alpha$  and  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-8 on the activation state of HSCs were examined, in comparison to the pro-fibrogenic mediator TGF- $\beta$ 1. LX-2 cells were stimulated for 24 or 48 hours with recombinant human form of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\alpha$  and  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-8, and also the pro-fibrogenic mediator TGF- $\beta$ 1. Two drugs were also evaluated, the anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody infliximab and the IL-1 receptor antagonist anakinra, regarding their inhibitory effects. In LX-2 human HSC, treatment with TGF- $\beta$ 1 are associated with downregulation of the metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3, with upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1, collagen type I  $\alpha$ 1, collagen type IV  $\alpha$ 1,  $\alpha$ -SMA, endothelin-1 and PDGF-BB. Cytokines and chemokines expression were found to be downregulated, excepting IL-6. In contrast, we observed that LX-2 exposure to IL-1, TNF- $\alpha$  and IL-8 can reverse the phenotype of pro-fibrogenic activated cells. Indeed, MMP-1, MMP-3 and MMP-9 were found elevated, associated with downregulation of  $\alpha$ -SMA and/or PDGF-BB, and a greater expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CXCL1 and CCL2. Lastly, we found that infliximab and anakinra successfully inhibits effects of TNF- $\alpha$  and IL-1 respectively in LX-2 cells. Infliximab and anakinra may be of value in preclinical trials in chronic liver disease. Overall, our results suggest that (i) pro-inflammatory mediators exert complex effects in HSCs via an MMP/TIMP imbalance, and (ii) targeting IL-1 signaling may be a potentially valuable therapeutic strategy in chronic liver diseases.



## Introduction

Fibrosis is a common pathologic consequence of a wide variety of chronic liver diseases, including hepatitis B and C virus infections, alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH), and results from an accumulation of extracellular matrix (ECM) following the activation and proliferation of hepatic stellate cells (HSCs). In fact, fibrosis is a pivotal pathological process in the progression to severe cirrhosis and the loss of liver function [1]. HSCs and portal fibroblasts are considered to be the primary sources of ECM during fibrogenesis [2]. However, activated HSCs can also contribute to the regression of fibrosis via the release of ECM-degrading proteases. During liver fibrogenesis, parenchymal injury and the resulting inflammatory reaction generate a large panel of signals that induce the release of specific transcription factors and morphogens by quiescent HSCs; this release activates the cells and gives them fibrogenic and proinflammatory properties [3]. Thus, the HSCs' exposure to multiple insults and/or inflammatory cytokines (such as platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and interleukin (IL)-1) prompts a transition from a quiescent state to an activated state.

HSC activation is a prominent determinant of hepatic immunoregulation during injury. In liver fibrosis, HSCs are important sources of TGF- $\beta$ —the key paracrine or autocrine mediator responsible for greater deposition of ECM proteins [4]. It has also been reported that activated human HSCs and myofibroblasts can produce IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-8 [5]. Furthermore, activated HSCs themselves may also produce inflammatory mediators (including chemokines) under baseline conditions or in response to signals such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  or lipopolysaccharide [6,7]. There is some evidence that certain chemokines (such as the CC chemokines RANTES, chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and CCL21) directly target HSCs and thus promote cell proliferation and migration [8]. Furthermore, the recent identification of receptors for profibrogenic chemokines (including CXCR4 [9], CCR1, CCR5 [10], CXCR2 [11] and CCR2 [12]) on the surface of HSCs has enlarged the repertoire of signals promoting cell activation. The ability to block chemokine receptors with small molecule inhibitors makes HSCs ideal targets for antifibrotic therapies and reinforces the need for human-cell-based models of inflammatory signaling and inflammatory control by drugs [13].

The LX-2 cell line (developed in S. Friedman's laboratory at the Mount Sinai School of Medicine, New York, NY) may constitute a good model of human HSCs and can thus avoid the need to use human primary cells [14]. The cell line was generated by the spontaneous immortalization of human primary HSCs (taken from a healthy donor) by low-serum incubation. LX-2 cells express  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin (SMA), vimentin, the intermediate filament protein glial fibrillary acidic protein, and the type  $\beta$  receptor for platelet-derived growth factor—suggesting that the LX-2 cells retain key features of activated/transdifferentiated HSCs. LX-2 cells also secrete pro-collagen, pro-matrix metalloproteinase (MMP)2, MT1-MMP (MMP14), Tissue Inhibitor of MetalloProteinases (TIMP)-1 and TIMP-2, all of which are characteristic features of activated HSCs [14]. In pharmacological studies, LX-2 cells have shown much the same physiological response as primary HSCs [15].

A better understanding of how the complex, inflammation-driven microenvironment can directly affect activated HSCs might lead to new antifibrotic strategies. To this end, we sought to characterize the response of LX-2 cells to activation with several pro-inflammatory cytokines (relative to activation with the well-known pro-fibrogenic mediator, TGF- $\beta$ 1). We focused our analysis on collagen expression, markers of fibrosis, and the MMP/TIMP imbalance. Furthermore, we evaluated the antifibrotic potential of two drugs commonly used to treat chronic inflammatory diseases (the anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody infliximab and the IL-1 receptor (IL-1r) antagonist anakinra).

## Materials and Methods

### Reagents

Recombinant human (rh) IL-6, IL-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-8 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor were purchased from R&D Systems (Abingdon, UK). rhIL-1 $\beta$  and gelatin solution were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's Modified Eagle Medium cell culture media, antibiotics, L-glutamine, sodium pyruvate and trypsin-EDTA were purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA). Fetal calf serum (FCS) was from Lonza (Levallois, France). Acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS), Tris, and bovine serum albumin were purchased from Eurobio (Les Ulis, France). Anti-collagen type I antibody was purchased from Millipore (Billerica, MA, USA). Anti-STAT3 and p-STAT3 antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anti-IL6R antibody was purchased from Abcam (Cambridge, UK). Anti-HSC70 antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Polyclonal secondary immunoglobulins/HRP were purchased from Dako (Les Ulis, France). The Pierce™ BCA protein assay kit, LDS sample buffer, MOPS SDS running buffer, 4–12% Bis-Tris Gel, Pierce® ECL western blotting substrate, anti-oxidant and sample reducing agent were purchased from Thermo Fisher Scientific (Saint-Herblain, France). Tris/glycine migration buffer and Trans-blot® Turbo™ transfer pack were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

### Cell culture and treatments

LX-2 cells were provided by S.L. Friedman (Mount Sinai School of Medicine, New York, NY) [14]. LX-2 cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% FCS, 50 IU/mL penicillin, 50  $\mu$ g/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate at 37°C, in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. The cells were used in experiments from passage 16 to passage 26.

Experiments were performed in 6-well plates. LX-2 cells were seeded at 3.10<sup>5</sup> cells per well, grown in 2 mL DMEM supplemented with 10% FCS for 24 hours, and then placed in DMEM supplemented with 2% FCS for 24 hours prior to experiments. Cells were treated with rh cytokines for 24 or 48 hours.

### Extraction of total RNA and real-time PCR

Total RNA was isolated from cells using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA). RNA quantity and purity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France). Total RNA (1  $\mu$ g) was reverse-transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time quantitative RT-PCR was performed with the fluorescent dye SYBR Green methodology using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the 7900HT fast real-time PCR system (Applied Biosystems). Primer pairs for each transcript were chosen with IDT software <http://eu.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/> and “blasted” with NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Amplification curves were read with SDS 2.3 software (Applied Biosystems) using the comparative cycle threshold method. The steady-state mRNA level for each gene of interest was normalized against GAPDH mRNA.

### ELISA and gelatinase (MMP-2 and MMP-9) assays

Conditioned media were collected and stored at -20°C until use. The production of pro-collagen I  $\alpha$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , and IL-6 were measured in the supernatant using a Duoset® ELISA kit (R&D Systems), according to the manufacturer's procedure. Briefly, conditioned media were added to plates coated with the appropriate capture antibody and incubated at

room temperature for 2 hours, followed by incubation with the appropriate biotinylated detection antibody. Streptavidin-conjugated horseradish-peroxidase was added to the plates, and the enzyme activity after the addition of substrate was detected with an ELISA microplate reader (POLARstar Omega, BMG LABTECH, Champigny sur Marne, France). The ELISA's sensitivity for human pro-collagen I  $\alpha$ 1, human IL-1 $\beta$ , human IL-8, human TNF- $\alpha$ , and human IL-6 were respectively 31.25–2000 pg/mL, 3.91–250 pg/mL, 31.25–2000 pg/mL, 15.63–1000 pg/mL, and 9.38–600 pg/mL.

The enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9 into the supernatant was determined by SDS-PAGE gelatin zymography. Gelatinases present in the supernatant degrade the gelatin matrix, leaving a clear band after staining the gel for proteins. Briefly, 15  $\mu$ L of supernatant were denatured in the absence of a reducing agent and electrophoresed in 7.5% SDS-PAGE containing 0.1% gelatin. The gels were incubated twice in the presence of 2.5% Triton X-100 at room temperature for 10 min, washed twice in distilled water for 20 min, and then incubated at 37°C overnight in a buffer containing 6.62 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> and 50 mM Tris (pH 8). Thereafter, the gels were stained with 0.1% Coomassie Blue, and proteolysis was detected as a white band against a blue background. The activity of MMP-2 and MMP-9 was determined by densitometric scanning of the bands and analysis using ImageJ software (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

## Western blotting

LX-2 cells were treated with 3 ng/mL of rhTGF- $\beta$ 1 for 24 h. HepaRG cells and LX-2 cells were treated with 3 ng/mL of rhIL-6 for 30 minutes or 24 h. The cells were washed with cold PBS, and finally resuspended in cell lysis buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.25% Sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 1% NP-40) supplemented with a protease inhibitor cocktail and a phosphatase inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) and sonicated for 30 seconds. Aliquots containing equivalent total protein content, as determined by the BCA procedure with bovine serum albumin as the standard, and supplemented with reducing agent and LDS sample buffer, were subjected to SDS/4–12% polyacrylamide gel electrophoresis in MOPS SDS running buffer with antioxidant, electrotransferred to 0.2  $\mu$ m nitrocellulose membranes, and incubated overnight at 4°C with primary antibodies directed against Collagen Type I, p-STAT3, STAT3, IL6R, and HSC70. After using the appropriate horseradish peroxidase conjugated antibody, membranes were incubated with Pierce<sup>®</sup> ECL western blotting substrate and bands were visualized and quantified by densitometry with Fusion-Capt software (Vilber Lourmat, Fusion FX7, France).

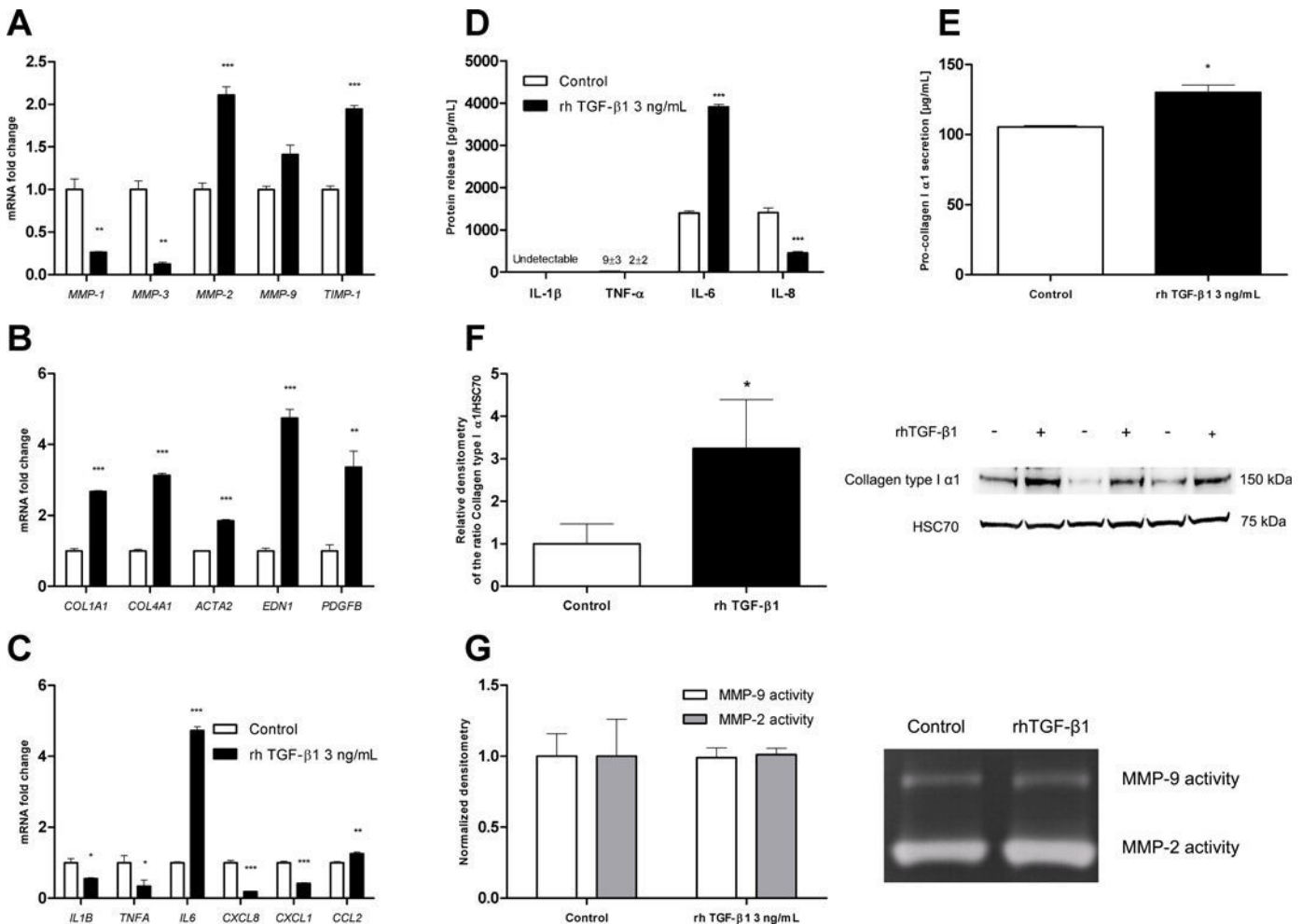
## Statistical analysis

The results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Intergroup differences in treatment effects were probed with an unpaired t test (for pairwise comparisons) or a one-way analysis of variance with Tukey's *post-hoc* test (for the comparison of more than two groups). All analyses were carried out using Prism software (version 5.0, Graphpad Software, La Jolla, CA, USA). In all analyses, a two-sided *p*-value <0.05 was considered to be statistically significant.

## Results

### LX-2 cells exhibit the same expression profile as normal HSCs

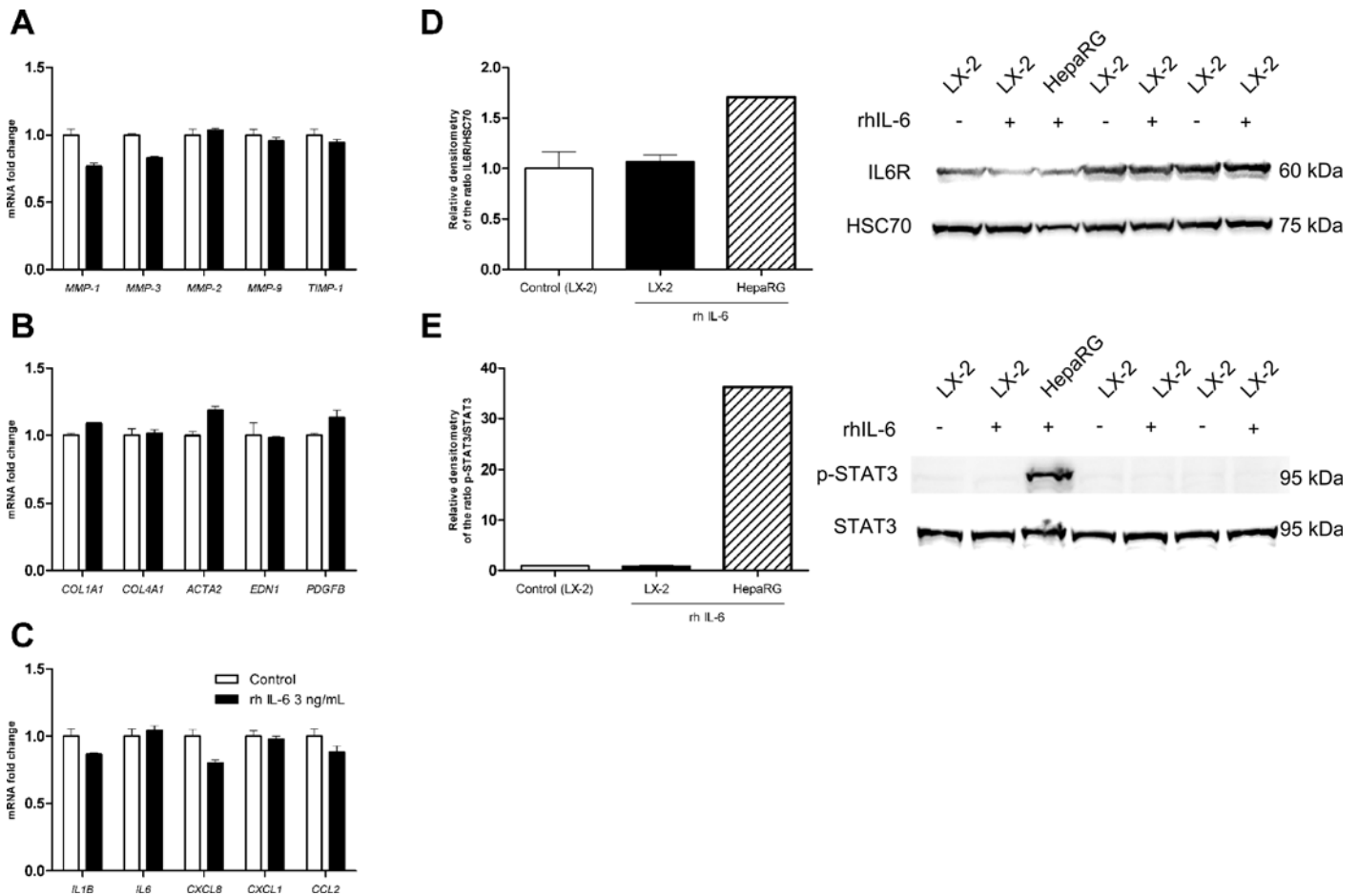
Treatment with 3 ng/mL TGF- $\beta$ 1 downregulated the mRNA expression of collagenases (MMP-1 and MMP-3) by LX-2 cells, whereas the mRNA expression of gelatinases MMPs (MMP-2 and MMP-9) and TIMP-1 (the main MMP inhibitor) was upregulated (Fig 1A). LX-2



**Fig 1. Effects of TGF- $\beta$ 1 treatment on the fibrolysis balance, fibrotic response and inflammatory response in LX-2 cells.** The cells were treated with 3 ng/mL rhTGF- $\beta$ 1 for 24 hours or 48 hours. **(A)** mRNA expression levels of metalloproteinases (MMP-1, MMP-3, MMP-2, MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) were measured and normalized against that of GAPDH (using real-time PCR) after 24 hours of treatment. **(B)** mRNA expression of fibrogenesis factors (COL1A1/collagen I  $\alpha$ 1, COL4A1/collagen IV  $\alpha$ 1), myofibroblast differentiation factors (ACTA2/ $\alpha$ -smooth muscle actin) and myofibroblast activation factors (EDN1/endothelin-1, PDGFB/platelet-derived growth factor-BB), as measured with real-time PCR and normalized against that of GAPDH after 24 hours of treatment. **(C)** mRNA expression of proinflammatory cytokines (IL1B/interleukin-1 $\beta$ , TNFA/tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL6/interleukin-6) and chemokines (CXCL8/interleukin-8, CXCL1/GRO $\alpha$ , CCL2/MCP1), as measured with real-time PCR and normalized against that of GAPDH after 24 hours of treatment. **(D)** IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 secretions into the supernatant by LX-2 cells were detected with an ELISA after 24 hours of treatment. **(E)** Pro-collagen I  $\alpha$ 1 secretion into the supernatant by LX-2 cells was detected with an ELISA after 48 hours of treatment. **(F)** Collagen type I  $\alpha$ 1 protein expression was determined by western blot of LX-2 cell lysates after 24 hours treatment and relative quantification was evaluated using densitometry. **(G)** Gelatinase activities of MMP-9 and MMP-2 released by LX-2 cells into the supernatant after 48 hours of treatment were evaluated by zymography and normalized densitometry. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , relative to a control.

doi:10.1371/journal.pone.0153118.g001

cells also expressed higher mRNA levels of myofibroblast markers (such as collagen type I  $\alpha$ 1, collagen type IV  $\alpha$ 1,  $\alpha$ -SMA, endothelin-1 and PDGF homodimer (PDGF-BB) (Fig 1B)). Treatment with rhTGF- $\beta$ 1 was associated with lower mRNA levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-8) and the neutrophil chemoattractant CXCL1, and higher mRNA levels of IL-6 and the monocyte chemoattractant CCL2 (Fig 1C). These results were confirmed at protein levels by ELISA in which IL-8 release was downregulated and IL-6 release upregulated after 24 hours treatment with rhTGF- $\beta$ 1. However, IL-1 $\beta$  levels were not detectable and TNF- $\alpha$  levels were barely detectable in both treated and control conditions (Fig 1D). The



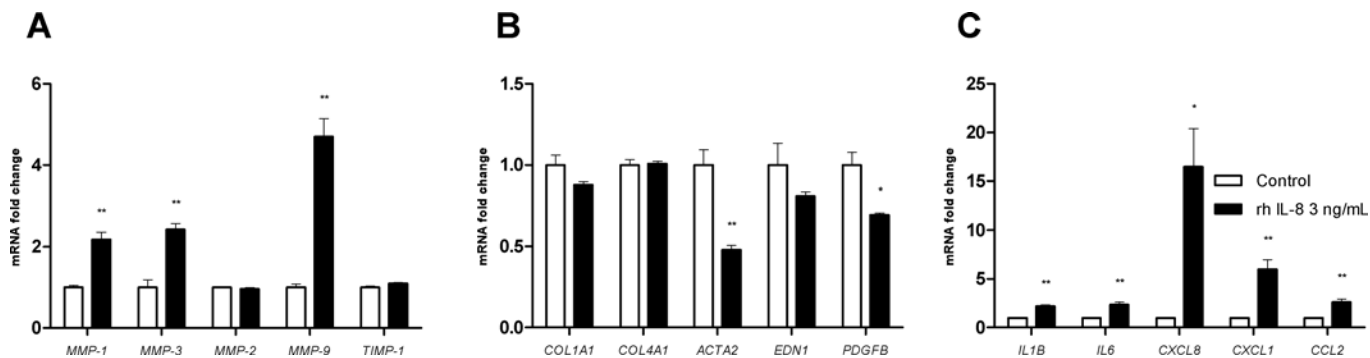
**Fig 2. Effects of IL-6 treatment on the fibrolysis balance, fibrotic response and inflammatory response in LX-2 cells.** The cells were treated with at 3 ng/mL rhIL-6 for 30 minutes or 24 hours. **(A)** mRNA expression of metalloproteinases (MMP-1, MMP-3, MMP-2, MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1), as measured with real-time PCR and normalized against that of GAPDH after 24 hours of treatment. **(B)** mRNA expression of fibrogenesis factors (COL1A1/collagen I  $\alpha$ 1, COL4A1/collagen IV  $\alpha$ 1), myofibroblast differentiation factors (ACTA2/ $\alpha$ -smooth muscle actin) and myofibroblast activation factors (EDN1/endothelin-1, PDGFB/platelet-derived growth factor-BB), as measured with real-time PCR and normalized against that of GAPDH after 24 hours of treatment. **(C)** mRNA expression of proinflammatory cytokines (IL1B/interleukin-1 $\beta$ , IL6/interleukin-6) and chemokines (CXCL8/interleukin-8, CXCL1/GRO $\alpha$ , CCL2/MCP1), as measured with real-time PCR and normalized against that of GAPDH after 24 hours of treatment. **(D)** IL6R protein expression was determined by western blot on HepaRG and LX-2 cells lysates after 24 hours treatment and relative quantification was evaluated using densitometry. **(E)** p-STAT3 protein expression was determined by western blot on HepaRG (positive control) and LX-2 cells lysates after 24 hours treatment and relative quantification was evaluated using densitometry. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0153118.g002

ELISA results showed that LX-2 cells were able to release large amounts of pro-collagen type I  $\alpha$ 1 into the supernatant. This release was enhanced by treatment with rhTGF- $\beta$ 1 for 48 hours (Fig 1E), correlated with the upregulation of protein expression of collagen I as observed with western blot (Fig 1F). Furthermore, the zymography results showed that gelatinase (MMP-2 and MMP-9) activity was not enhanced (Fig 1G).

### IL-6 has no effect on LX-2 cells

Treatment of LX-2 cells with 3 ng/mL of IL-6 for 24 hours was not associated with high or lower mRNA expression levels (relative to control experiments) of MMP-1, MMP-3, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 (Fig 2A), collagen types I and IV  $\alpha$ 1, endothelin-1, PDGF-BB,  $\alpha$ -SMA (Fig 2B), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CXCL1 or CCL2 (Fig 2C). The absence of the IL6 receptor in LX-2 could be an explanation for these results. However, we showed that IL6R was detectable by western



**Fig 3. Effects of CXCL8/IL-8 treatment on the fibrolysis balance, fibrotic response and inflammatory response in LX-2 cells.** The cells were treated with 3 ng/mL rhIL-8 for 24 hours or 48 hours. **(A)** mRNA expression of metalloproteinases (MMP-1, MMP-3, MMP-2, MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1), as measured with real-time PCR and normalized against that of GAPDH after 24 hours of treatment. **(B)** mRNA expression of fibrogenesis factors (COL1A1/collagen I  $\alpha$ 1, COL4A1/collagen IV  $\alpha$ 1), myofibroblast differentiation factors (ACTA2/ $\alpha$ -smooth muscle actin) and myofibroblast activation factors (EDN1/endothelin-1, PDGFB/platelet-derived growth factor-BB), as measured with real-time PCR and normalized against that of GAPDH after 24 hours of treatment. **(C)** mRNA expression of proinflammatory cytokines (IL1B/interleukin-1 $\beta$ , IL6/interleukin-6) and chemokines (CXCL8/interleukin-8, CXCL1/GRO $\alpha$ , CCL2/MCP1), as measured with real-time PCR and normalized against that of GAPDH after 24 hours of treatment. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , relative to a control.

doi:10.1371/journal.pone.0153118.g003

blot in LX-2 cells at a level comparable to that in HepaRG cells (Fig 2D). IL-6 treatment did not induce the upregulation of this receptor in LX-2 cells (Fig 2D), and also did not induce the phosphorylation of STAT3 in LX-2 cells while it was observed in HepaRG cells (Fig 2E).

### CXCL8/IL-8 and TGF- $\beta$ 1 have opposite effects on LX-2 cells

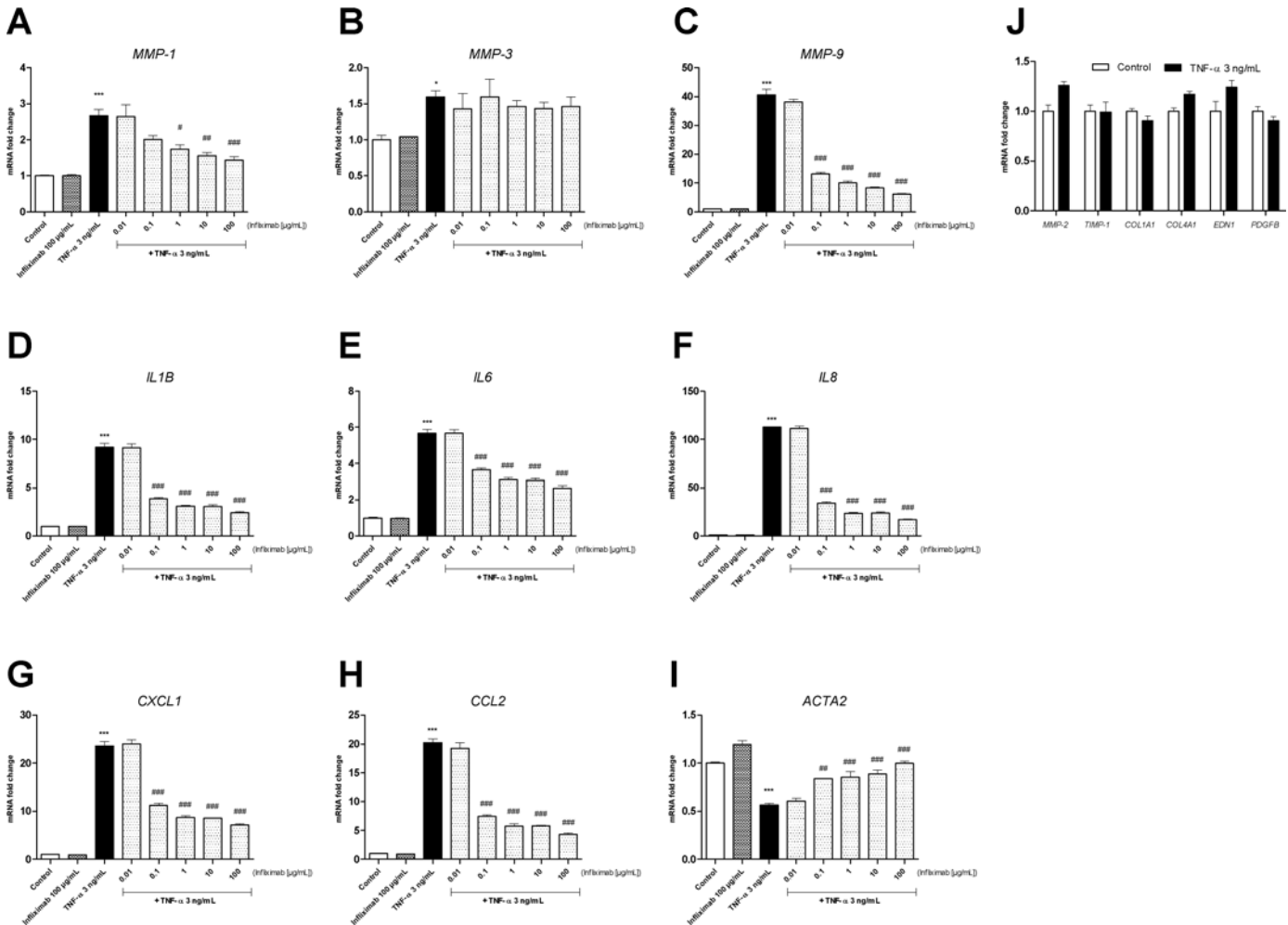
Treatment with 3 ng/mL IL-8 was associated with mRNA upregulation of MMP-1, MMP-3 and MMP-9 but not MMP-2 and TIMP-1 (Fig 3A). IL-8 did not induce a relative reduction of mRNA expression of the collagen types I and IV  $\alpha$ 1 or endothelin-1 but was associated with lower mRNA levels for  $\alpha$ -SMA and PDGF-BB (Fig 3B). Lastly, we observed that IL-8 was associated with greater mRNA expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CXCL1 and CCL2 in LX-2 cells (Fig 3C).

### TNF- $\alpha$ and CXCL8/IL-8 have similar effects on LX-2 cells

Treatment with 3 ng/mL TNF- $\alpha$  was associated with upregulation of MMP-1, MMP-3, MMP-9, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CXCL1 and CCL2 mRNA expression, and downregulation of  $\alpha$ -SMA mRNA expression (Fig 4A–4I). There were no differences (relative to control experiments) in mRNA expression levels of MMP-2, TIMP-1, collagen types I and IV  $\alpha$ 1, endothelin-1 and PDGF-BB (Fig 4J). Furthermore, we observed that infliximab (a monoclonal antibody that targets soluble or membrane-bound forms of human TNF) inhibited the effects of TNF- $\alpha$  on LX-2 cells at a concentration of 1  $\mu$ g/mL (for MMP-1) and 0.1  $\mu$ g/mL (for MMP-9, IL1B, IL6, IL8, CXCL1, CCL2, and ACTA2). However, infliximab treatment did not inhibit the expression of MMP-3; this suggests that TNF- $\alpha$  induces the production of another factor that in turn regulates the expression of MMP-3 at the mRNA level (Fig 4B).

### IL-1 $\beta$ and IL-1 $\alpha$ have similar effects on LX-2 cells

IL-1 $\beta$  (3 ng/mL) upregulated mRNA expression for MMP-1, MMP-3 and MMP-9 but not for MMP-2 and TIMP-1 (Fig 5A). It downregulated mRNA expression of collagen type IV  $\alpha$ 1,  $\alpha$ -SMA, endothelin-1 and PDGF-BB but did not modify collagen type I  $\alpha$ 1 expression (Fig 5B). Lastly, we observed that IL-1 $\beta$  upregulated mRNA expression of itself, IL-6, IL-8, CXCL1 and CCL2 in LX-2 cells (Fig 5C). All the effects of rhIL-1 $\beta$  were totally inhibited by a 1-hour



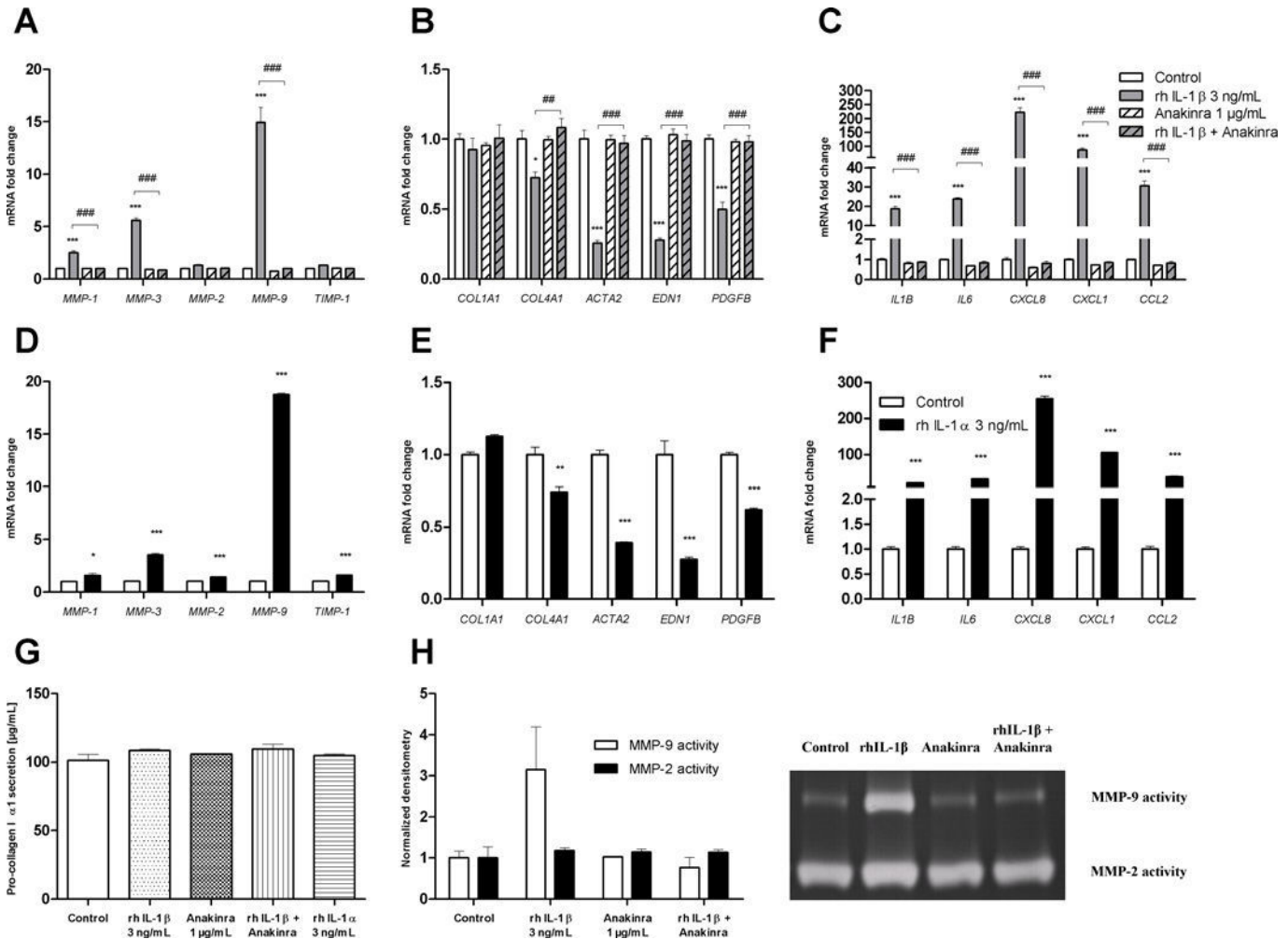
**Fig 4. Effects of TNF- $\alpha$  treatment on the fibrolysis balance, fibrotic response and inflammatory response in LX-2 cells.** The cells were pre-treated (or not) with the anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody infliximab (at a dose ranging from 0.01 to 100  $\mu$ g/mL) and then treated with 3 ng/mL rhTNF- $\alpha$  for 24 hours. **(A)** mRNA expression of metalloproteinases (MMP-1, MMP-3 and MMP-9) myofibroblast differentiation factors (ACTA2/ $\alpha$ -smooth muscle actin), and proinflammatory cytokines (IL1B/interleukin-1 $\beta$ , IL6/interleukin-6) and chemokines (CXCL8/interleukin-8, CXCL1/GRO $\alpha$ , CCL2/MCP1), as measured with real-time PCR and normalized against that of GAPDH after 24 hours of treatment. **(B)** mRNA expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1), MMP-2, fibrogenesis factors (COL1A1/collagen I  $\alpha$ 1, COL4A1/collagen IV  $\alpha$ 1) and myofibroblast activation factors (EDN1/endothelin-1, PDGFB/platelet-derived growth factor-BB), as measured with real-time PCR and normalized against that of GAPDH after 24 hours of treatment. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , relative to a control. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ , relative to TNF- $\alpha$ .

doi:10.1371/journal.pone.0153118.g004

pretreatment of LX-2 cells with 1  $\mu$ g/mL of the IL-1 receptor antagonist anakinra. rhIL-1 $\alpha$  has the same affinity as rhIL-1 $\beta$  for the IL-1 receptor and was used at a concentration of 3 ng/mL to treat LX-2 cells. rhIL-1 $\alpha$  was associated with same changes as IL-1 $\beta$  in terms of the mRNA expression of MMPs and TIMPs (except for MMP-2 and TIMP-1, which were upregulated) (Fig 5D), fibrogenic markers (Fig 5E) and inflammatory cytokines and chemokines (Fig 5F). We confirmed that neither IL-1 $\beta$  nor IL-1 $\alpha$  treatment (for 48 hours) was associated with the greater release of pro-collagen type I  $\alpha$ 1 into the supernatant (Fig 5G).

## Discussion

The present study investigated LX-2 cells' expression of the chemokines IL-8, CCL2/MCP-1 and CXCL1/GRO $\alpha$  and the cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6 in response to treatment with pro-



**Fig 5. Effects of IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  treatment on the fibrolysis balance, fibrotic response and inflammatory response in LX-2 cells.** The cells were pre-treated (or not) with the IL-1 receptor antagonist anakinra (1  $\mu$ g/mL) and then treated with 3 ng/mL rhIL-1 $\beta$  or 3 ng/mL rhIL-1 $\alpha$  for 24 hours or 48 hours. **(A, D)** mRNA expression of metalloproteinases (MMP-1, MMP-3, MMP-2, MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1), as measured with real-time PCR and normalized against that of GAPDH after 24 hours of treatment. **(B, E)** mRNA expression of fibrogenesis factors (COL1A1/collagen I  $\alpha$ 1, COL4A1/collagen IV  $\alpha$ 1), myofibroblast differentiation factors (ACTA2/ $\alpha$ -smooth muscle actin) and myofibroblast activation factors (EDN1/endothelin-1, PDGFB/platelet-derived growth factor-BB), as measured with real-time PCR and normalized against that of GAPDH after 24 hours of treatment. **(C, F)** mRNA expression of proinflammatory cytokines (IL1B/interleukin-1 $\beta$ , IL6/interleukin-6) and chemokines (CXCL8/interleukin-8, CXCL1/GRO $\alpha$ , CCL2/MCP1), as measured with real-time PCR and normalized against that of GAPDH after 24 hours of treatment. **(G)** Pro-collagen I  $\alpha$ 1 secretion into the supernatant by LX-2 cells was detected with an ELISA after 48 hours of treatment. **(H)** Gelatinase activities of MMP-9 and MMP-2 released by LX-2 cells into the supernatant after 48 hours of treatment were evaluated by zymography and normalized densitometry. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , relative to a control. #  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$ , relative to IL-1 $\beta$ .

doi:10.1371/journal.pone.0153118.g005

inflammatory cytokines and chemokines (such as IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-8 and TNF- $\alpha$ ). We found that the LX-2 HSC cell line became pro-fibrogenic when treated with TGF- $\beta$ 1 and anti-fibrogenic when treated with IL-1 $\beta$ . Indeed, the pro-fibrogenic vs. anti-fibrogenic environment in LX-2 cells appeared to depend on the MMP/TIMP imbalance and the latter's impact on collagen production. Moreover, experiments with anakinra and infliximab showed that the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are major players in fibroblast/macrophage mediated chronic liver fibrosis. These drugs may therefore be of value for the treatment of liver diseases.

Activated HSCs contribute significantly to liver fibrogenesis through proliferation, chemotaxis, ECM synthesis and contractility. In recent years, it has become clear that HSCs are



prominent determinants of hepatic immunoregulation during injury. The cells express a battery of chemokines (including CCL2, CCL5, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, and CX3CL3) known to recruit neutrophils, macrophages/monocytes, natural killer cells, dendritic cells, natural killer T cells and other T cells [16]. Furthermore, activated HSCs secrete inflammatory mediators in response to signals such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and lipopolysaccharide [6,7]. Hence, HSCs amplify the inflammatory response in a context of liver disease.

TGF- $\beta$  is a well-characterized, pro-fibrotic cytokine that activates HSCs, induces the latter's expression of matrix-producing genes and inhibits degradation of ECM by downregulating MMP expression and promoting TIMP expression; this leads to the excessive deposition of collagen fibers and promotes liver fibrosis [17,18]. In line with the literature data, our present results showed that HSCs LX-2 cells are able to respond to TGF- $\beta$ 1 by increasing the mRNA expression of MMP-2, TIMP-1,  $\alpha$ -SMA, endothelin-1, PDGF-BB, type IV collagen  $\alpha$ 1 and type I collagen  $\alpha$ 1 at the mRNA and protein levels. TGF- $\beta$ 1 also downregulated mRNA and protein levels of MMP-1, MMP-3, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CXCL1 and CCL2. Surprisingly, we found that TGF- $\beta$ 1 was able to induce IL-6 expression. In view of the properties of TGF- $\beta$  (which is both fibrogenic and immunosuppressant), potent pro-inflammatory cytokines like IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  are unlikely to display pro-fibrogenic activity.

We also observed that the treatment of LX-2 cells with TNF- $\alpha$  upregulated the mRNA expression of inflammatory cytokines and chemokines, MMP-1, MMP-3 and MMP-9 and downregulated mRNA expression of  $\alpha$ -SMA. This is consistent with a report of TNF- $\alpha$ 's direct antifibrotic effect on HSCs [19]. Our results also showed that TNF- $\alpha$  stimulates the release of MMPs and thereby prevents the accumulation of ECM. However, we did not observe low mRNA expression of fibrotic marker genes (pro-collagen type I  $\alpha$ 1, MMP-2, TIMP-1, endothelin-1 and PDGF-BB and pro-collagen IV  $\alpha$ 1). We also found that IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  have the same effects as TNF- $\alpha$  on LX-2 cells. Moreover, IL-1 signaling had an antifibrogenic effect on LX-2 cells, with upregulation of MMP expression and MMP-9 activity, no difference in MMP-2 and TIMP-1 expression levels, and downregulation of pro-collagen IV  $\alpha$ 1,  $\alpha$ -SMA, endothelin-1 and PDGF-BB. However, we cannot conclude that IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  have antifibrogenic role because treatments with these cytokines were not associated with differences in mRNA or protein levels of pro-collagen I  $\alpha$ 1. However, it has been shown that MMP-9 induces the maturation of TGF- $\beta$  [20], thereby improving fibrogenesis in the longer term.

IL-6 is a pleiotropic cytokine involved in inflammation, hematopoiesis and immune regulation. Treatment with IL-6 reportedly reduces carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced acute and chronic liver injury and fibrosis [21]. Furthermore, elevated blood levels of IL-6 have been observed in patients with NAFLD, and it is thought that IL-6 can induce insulin resistance and inflammation in the liver [22,23]. These observations indicated that IL-6 has a role in the development of NAFLD. Nevertheless, IL-6 did not have any effect on LX-2 cells in the present study—suggesting that this cytokine is not a valuable factor in the treatment of chronic liver disease. However, we showed that LX-2 cells express the IL6 receptor, but failed to induce the phosphorylation of the downstream signaling STAT3 pathway. These results suggested that this receptor is ineffective, which might be due to an impairment of the glycoprotein 130. Indeed, this protein is essential for the signal transduction following cytokine engagement.

The chemokine IL-8 is produced by a variety of neutrophil-activating cells. Peripheral neutrophilia and liver neutrophil infiltration are frequently noted in patients with alcoholic liver disease [24,25]. Individuals with advanced liver disease express abnormally high levels of IL-8 [26,27], and elevated serum levels of IL-8 are correlated with a higher mortality rate. Our present results show that like TNF- $\alpha$  and IL-1, IL-8 have some antifibrogenic effects opposed to TGF- $\beta$ 1, in which it upregulated the mRNA expression levels of various cytokines/chemokines and MMP-1, MMP-3 and MMP-9 in LX-2 cells. In contrast, IL-8 treatment was associated

with the downregulation of  $\alpha$ -SMA and PDGF-BB mRNA expression—suggesting a more complex role for this chemokine in liver disease.

We also evaluated the potential anti-inflammatory effects of infliximab on the stimulation of LX-2 cells by TNF- $\alpha$ . Indeed, circulating levels of TNF- $\alpha$  are elevated in patients with liver fibrosis and are associated with a poor prognosis [28]. Experiments in a variety of models and diseases have shown that TNF- $\alpha$  accentuates liver fibrosis by increasing hepatocellular damage. TNF- $\alpha$  mediates alcohol- or dimethylnitrosamine-induced liver injury in animal models [29,30] and has an important role in the perpetuation of HSC activation *in vitro* and the synthesis of ECM [31–33]. Furthermore, the TNF- $\alpha$ -induced liver failure and exacerbation of liver damage following exposure to the hepatotoxin CCl<sub>4</sub> were abrogated by treatment with a soluble TNF receptor [34] and were inhibited in TNF-knockout mice [35]. TNF- $\alpha$  is also known to induce fibrosis in other models. In a model of pulmonary fibrosis, TNF-receptor-knockout mice were protected from the development of fibroproliferative lesions [36]. Reducing TNF- $\alpha$  production or blocking TNF- $\alpha$ 's action significantly minimizes liver injury caused by alcohol toxicity, acetaminophen overdose or ischemia/reperfusion-associated liver injury in animal models [37–40]. Infliximab has been tested in the treatment of severe alcoholic hepatitis [41]; although it reduced liver damage and neutrophil infiltration, the possible attenuation of fibrosis was not evaluated. We presently report that TNF- $\alpha$  treatment of LX-2 cells was associated with differences (relative to control experiments) in the mRNA expression of genes coding for inflammatory cytokines/chemokines, MMPs and  $\alpha$ -SMA. Furthermore, treatment with infliximab was associated with lower expression of most of the studied genes (with the notable exception of MMP-3). However, cytokine and chemokine expression levels remained high.

With regard to the observed effects of IL-1, we also analyzed the effect of anakinra. In fact, IL-1 $\beta$  has recently come back under the spotlight in the field of liver disease. IL-1 can directly activate HSCs and stimulate them to produce MMP-9, MMP-13 and TIMP-1, resulting in liver fibrogenesis. In contrast, IL-1R-knock-out mice are less likely to sustain liver damage or develop fibrosis [42]. Furthermore, the machinery of the inflammasome pathway (which regulates the maturation and liberation of IL-1 $\beta$ ) is known to be expressed by HSCs, and mice lacking inflammasome components suffer from lower levels of CCl<sub>4</sub>- and TAA-induced liver fibrosis [43]. IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  knock-out mice are also less likely to develop liver fibrosis in animal models of steatohepatitis [44]. Petrasek and colleagues have shown that blockade of the IL-1 receptor 1 in a rodent model of alcoholic liver disease significantly reduced steatosis, inflammation and injury [45]. Similarly, IL-1 receptor antagonists were found to protect rats against the development of dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis [46], and blocking IL-1 signaling was able to markedly attenuate alcohol-induced liver inflammation and pro-steatotic MCP-1/CCL2 levels in hepatocytes, and increases Toll-like-receptor-4-dependent upregulation of inflammatory signaling in macrophages [45].

We also found that IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  had the same effects on LX-2 cells, which are similar to the effects of TNF- $\alpha$ . The fact that the IL-1 receptor antagonist anakinra markedly inhibited IL-1 $\beta$ 's effects on LX-2 cells suggests that this drug could be tested as an anti-inflammatory in patients with liver disease. In contrast to anti-TNF approaches (the value of which is compromised by infectious complications) [47,48], anakinra has an excellent safety profile. Its use has not been associated with adverse reactions or superinfections during the long-term treatment of patients with rheumatoid arthritis [49] or in the acute treatment of patients with sepsis [50]. Further research in the field of liver disease is therefore justified. Much as with anakinra, we also found that the anti-TNF- $\alpha$  agent infliximab was associated with differences in the mRNA expression of genes coding for inflammatory cytokines/chemokines, MMPs and  $\alpha$ -SMA. Infliximab downregulated the expression of genes for cytokines, chemokines and various MMPs. This finding also suggests that infliximab should be tested as a treatment for chronic liver

diseases. However, the LX-2 cells' expression levels of cytokines and chemokines were significantly higher after anakinra treatment than after infliximab treatment.

In conclusion, our present results clearly show that LX-2 HSCs become pro-fibrogenic after treatment with TGF- $\beta$ 1 and anti-fibrogenic after treatment with IL-1 $\beta$ . These pro- and anti-fibrogenic effects were clearly dependent on the LX-2 cells' MMP/TIMP imbalance and production of collagen. Moreover, experiments with anakinra and infliximab showed that the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are significantly involved in the pro-inflammatory process that controls fibroblast/macrophage-mediated chronic liver fibrosis. These findings also suggest that infliximab and (to a lesser extent) anakinra may be of value as treatment options in patients with chronic liver disease.

## Supporting Information

**S1 Table. Primers used in this study for real-time PCR assay.**  
(DOCX)

## Acknowledgments

The authors thank Dr. S.L. Friedman (Mount Sinai School of Medicine, New York, NY) for his generous gift of LX-2 cells.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SR VL EB. Performed the experiments: SR AB. Analyzed the data: SR. Contributed reagents/materials/analysis tools: SR. Wrote the paper: SR TG VL EB.

## References

1. Wick G, Grundtman C, Mayerl C, Wimpissinger T-F, Feichtinger J, Zelger B, et al. The immunology of fibrosis. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31: 107–135. doi: [10.1146/annurev-immunol-032712-095937](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095937) PMID: [23516981](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23516981/)
2. Mallat A, Lotersztajn S. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 5. Novel insights into liver fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013; 305: C789–799. doi: [10.1152/ajpcell.00230.2013](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00230.2013) PMID: [23903700](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23903700/)
3. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*. 2013; 3: 1473–1492. doi: [10.1002/cphy.c120035](https://doi.org/10.1002/cphy.c120035) PMID: [24265236](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24265236/)
4. Hayashi H, Sakai T. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011; 300: G729–738. doi: [10.1152/ajpgi.00013.2011](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00013.2011) PMID: [21350186](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21350186/)
5. Patil PB, Joshi M, Kuna VK, Xu B, Johannesson L, Olausson M, et al. CD271 identifies functional human hepatic stellate cells, which localize in peri-sinusoidal and portal areas in liver after partial hepatectomy. *Cytotherapy*. 2014; 16: 990–999. doi: [10.1016/j.jcyt.2014.03.001](https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.03.001) PMID: [24831840](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24831840/)
6. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008; 88: 125–172. doi: [10.1152/physrev.00013.2007](https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007) PMID: [18195085](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18195085/)
7. Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001; 21: 397–416. doi: [10.1055/s-2001-17554](https://doi.org/10.1055/s-2001-17554) PMID: [11586468](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11586468/)
8. Schwabe RF, Bataller R, Brenner DA. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003; 285: G949–958. doi: [10.1152/ajpgi.00215.2003](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00215.2003) PMID: [12829440](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12829440/)
9. Hong F, Tuyama A, Lee TF, Loke J, Agarwal R, Cheng X, et al. Hepatic stellate cells express functional CXCR4: role in stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ -mediated stellate cell activation. *Hepatology*. 2009; 49: 2055–2067. doi: [10.1002/hep.22890](https://doi.org/10.1002/hep.22890)
10. Seki E, De Minicis S, Gwak G-Y, Kluwe J, Inokuchi S, Bursill CA, et al. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 2009; 119: 1858–1870. PMID: [19603542](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19603542/)

11. Stefanovic L, Brenner DA, Stefanovic B. Direct hepatotoxic effect of KC chemokine in the liver without infiltration of neutrophils. *Exp Biol Med* Maywood NJ. 2005; 230: 573–586.
12. Seki E, de Minicis S, Inokuchi S, Taura K, Miyai K, van Rooijen N, et al. CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* Baltim Md. 2009; 50: 185–197. doi: [10.1002/hep.22952](https://doi.org/10.1002/hep.22952)
13. Cohen-Naftaly M, Friedman SL. Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease. *Ther Adv Gastroenterol*. 2011; 4: 391–417. doi: [10.1177/1756283X11413002](https://doi.org/10.1177/1756283X11413002)
14. Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*. 2005; 54: 142–151. doi: [10.1136/gut.2004.042127](https://doi.org/10.1136/gut.2004.042127) PMID: [15591520](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15591520/)
15. Ghazwani M, Zhang Y, Gao X, Fan J, Li J, Li S. Anti-fibrotic effect of thymoquinone on hepatic stellate cells. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm*. 2014; 21: 254–260. doi: [10.1016/j.phymed.2013.09.014](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.014)
16. Matsuoka M, Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology* Baltim Md. 1990; 11: 599–605.
17. Liu X, Hu H, Yin JQ. Therapeutic strategies against TGF- $\beta$  signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2006; 26: 8–22. doi: [10.1111/j.1478-3231.2005.01192.x](https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01192.x)
18. Cui Q, Wang Z, Jiang D, Qu L, Guo J, Li Z. HGF inhibits TGF- $\beta$ 1-induced myofibroblast differentiation and ECM deposition via MMP-2 in Achilles tendon in rat. *Eur J Appl Physiol*. 2011; 111: 1457–1463. doi: [10.1007/s00421-010-1764-4](https://doi.org/10.1007/s00421-010-1764-4) PMID: [21165643](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21165643/)
19. Varela-Rey M, Fontán-Gabás L, Blanco P, López-Zabalza MJ, Iraburu MJ. Glutathione depletion is involved in the inhibition of procollagen alpha1(I) mRNA levels caused by TNF-alpha on hepatic stellate cells. *Cytokine*. 2007; 37: 212–217. doi: [10.1016/j.cyto.2007.03.013](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.03.013) PMID: [17485223](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17485223/)
20. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*. 2000; 14: 163–176. PMID: [10652271](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10652271/)
21. Kovalovich K, DeAngelis RA, Li W, Furth EE, Ciliberto G, Taub R. Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology* Baltim Md. 2000; 31: 149–159. doi: [10.1002/hep.510310123](https://doi.org/10.1002/hep.510310123)
22. Tarantino G, Conca P, Pasanisi F, Ariello M, Mastrolia M, Arena A, et al. Could inflammatory markers help diagnose nonalcoholic steatohepatitis? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009; 21: 504–511. doi: [10.1097/MEG.0b013e3283229b40](https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3283229b40) PMID: [19318968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19318968/)
23. Tarantino G, Savastano S, Colao A. Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. *World J Gastroenterol*. 2010; 16: 4773–4783. PMID: [20939105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20939105/)
24. Neuman MG. First International Symposium on the molecular pathology and clinical aspects of the inflamed liver: alcohol and cytokines. *Clin Investig Med Médecine Clin Exp*. 1998; 21: 283–286.
25. Hill DB, Marsano LS, McClain CJ. Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology* Baltim Md. 1993; 18: 576–580.
26. Mortensen C, Andersen O, Krag A, Bendtsen F, Møller S. High-sensitivity C-reactive protein levels predict survival and are related to haemodynamics in alcoholic cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2012; 24: 619–626. doi: [10.1097/MEG.0b013e328351db6e](https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e328351db6e) PMID: [22441510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22441510/)
27. Ishikawa M, Uemura M, Matsuyama T, Matsumoto M, Ishizashi H, Kato S, et al. Potential role of enhanced cytokinemia and plasma inhibitor on the decreased activity of plasma ADAMTS13 in patients with alcoholic hepatitis: relationship to endotoxemia. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010; 34 Suppl 1: S25–33. doi: [10.1111/j.1530-0277.2008.00850.x](https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00850.x) PMID: [19094193](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19094193/)
28. Odeh M, Sabo E, Srugo I, Oliven A. Relationship between tumor necrosis factor-alpha and ammonia in patients with hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Ann Med*. 2005; 37: 603–612. doi: [10.1080/07853890500317414](https://doi.org/10.1080/07853890500317414) PMID: [16338762](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16338762/)
29. Yin M, Wheeler MD, Kono H, Bradford BU, Gallucci RM, Luster MI, et al. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology*. 1999; 117: 942–952. PMID: [10500078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10500078/)
30. Kitamura K, Nakamoto Y, Akiyama M, Fujii C, Kondo T, Kobayashi K, et al. Pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55-mediated signals in dimethylnitrosamine-induced murine liver fibrosis. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 2002; 82: 571–583.
31. Knittel T, Müller L, Saile B, Ramadori G. Effect of tumour necrosis factor-alpha on proliferation, activation and protein synthesis of rat hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 1997; 27: 1067–1080. PMID: [9453433](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9453433/)
32. Hellerbrand C, Jobin C, Licato LL, Sartor RB, Brenner DA. Cytokines induce NF-kappaB in activated but not in quiescent rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol*. 1998; 275: G269–278. PMID: [9688654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9688654/)

33. Connolly MK, Bedrosian AS, Mallen-St Clair J, Mitchell AP, Ibrahim J, Stroud A, et al. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF-alpha. *J Clin Invest*. 2009; 119: 3213–3225. doi: [10.1172/JCI37581](https://doi.org/10.1172/JCI37581) PMID: [19855130](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19855130/)
34. Czaja MJ, Xu J, Alt E. Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. *Gastroenterology*. 1995; 108: 1849–1854. PMID: [7768392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7768392/)
35. Sudo K, Yamada Y, Moriwaki H, Saito K, Seishima M. Lack of tumor necrosis factor receptor type 1 inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Cytokine*. 2005; 29: 236–244. doi: [10.1016/j.cyto.2004.11.001](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.11.001) PMID: [15760680](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15760680/)
36. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal*. 2002; 14: 477–492. PMID: [11897488](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11897488/)
37. Diehl AM. Tumor necrosis factor and its potential role in insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*. 2004; 8: 619–638, x. doi: [10.1016/j.cld.2004.04.012](https://doi.org/10.1016/j.cld.2004.04.012) PMID: [15331067](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15331067/)
38. Osawa Y, Hoshi M, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Kozawa O. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in hepatic stellate cells. *PLoS One*. 2013; 8: e65251. doi: [10.1371/journal.pone.0065251](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065251) PMID: [23755201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23755201/)
39. Koca SS, Bahcecioglu IH, Poyrazoglu OK, Ozercan IH, Sahin K, Ustundag B. The treatment with antibody of TNF-alpha reduces the inflammation, necrosis and fibrosis in the non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine- and choline-deficient diet. *Inflammation*. 2008; 31: 91–98. doi: [10.1007/s10753-007-9053-z](https://doi.org/10.1007/s10753-007-9053-z) PMID: [18066656](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18066656/)
40. Gäbele E, Froh M, Arteel GE, Uesugi T, Hellerbrand C, Schölmerich J, et al. TNFalpha is required for cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 378: 348–353. doi: [10.1016/j.bbrc.2008.10.155](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.155) PMID: [18996089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18996089/)
41. Tilg H, Jalan R, Kaser A, Davies NA, Offner FA, Hodges SJ, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol*. 2003; 38: 419–425. PMID: [12663232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12663232/)
42. Gieling RG, Wallace K, Han Y-P. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009; 296: G1324–1331. doi: [10.1152/ajpgi.90564.2008](https://doi.org/10.1152/ajpgi.90564.2008) PMID: [19342509](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19342509/)
43. Watanabe A, Sohail MA, Gomes DA, Hashmi A, Nagata J, Sutterwala FS, et al. Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009; 296: G1248–1257. doi: [10.1152/ajpgi.90223.2008](https://doi.org/10.1152/ajpgi.90223.2008) PMID: [19359429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19359429/)
44. Kamari Y, Shaish A, Vax E, Shemesh S, Kandel-Kfir M, Arbel Y, et al. Lack of interleukin-1 $\alpha$  or interleukin-1 $\beta$  inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice. *J Hepatol*. 2011; 55: 1086–1094. doi: [10.1016/j.jhep.2011.01.048](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.01.048) PMID: [21354232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21354232/)
45. Petrasek J, Bala S, Csak T, Lippai D, Kodys K, Menashy V, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J Clin Invest*. 2012; 122: 3476–3489. doi: [10.1172/JCI60777](https://doi.org/10.1172/JCI60777) PMID: [22945633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22945633/)
46. Mancini R, Benedetti A, Jezequel AM. An interleukin-1 receptor antagonist decreases fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rat liver. *Virchows Arch Int J Pathol*. 1994; 424: 25–31.
47. O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ, Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases, Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Alcoholic liver disease. *Hepatol Baltim Md*. 2010; 51: 307–328. doi: [10.1002/hep.23258](https://doi.org/10.1002/hep.23258)
48. Naveau S, Chollet-Martin S, Dharancy S, Mathurin P, Jouet P, Piquet M- A, et al. A double-blind randomized controlled trial of infliximab associated with prednisolone in acute alcoholic hepatitis. *Hepatol Baltim Md*. 2004; 39: 1390–1397. doi: [10.1002/hep.20206](https://doi.org/10.1002/hep.20206)
49. Salliot C, Dougados M, Gossec L. Risk of serious infections during rituximab, abatacept and anakinra treatments for rheumatoid arthritis: meta-analyses of randomised placebo-controlled trials. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68: 25–32. doi: [10.1136/ard.2007.083188](https://doi.org/10.1136/ard.2007.083188) PMID: [18203761](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18203761/)
50. Opal SM, Fisher CJ, Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med*. 1997; 25: 1115–1124. PMID: [9233735](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9233735/)

### **3- Conclusion**

Notre étude montre que les CEF LX-2 deviennent pro-fibrogénique après un traitement avec le TGF- $\beta$ 1 et plutôt anti-fibrogénique avec l'IL-1 $\beta$ . Ces effets pro- et anti-fibrotiques sont clairement dépendant de la balance entre les MMP et les TIMP, ainsi que de la production de collagène. De plus, les expérimentations avec l'anakinra et l'infliximab montrent que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  sont significativement impliqués dans le processus inflammatoire qui contrôle la fibrose hépatique induite par l'axe des macrophages et fibroblastes *in vivo*. Ainsi, l'infliximab et l'anakinra pourrait s'avérer être de bonnes options thérapeutiques dans les pathologies chroniques du foie.



# **Chapitre III : Rôle de l'activation de l'inflammasome dans les macrophages en co-culture avec des HSC, sur leurs activités fibrolytiques et fibrogéniques**

## **1- Contexte scientifique**

L'inflammasome est impliqué dans de nombreuses pathologies inflammatoires et également dans la fibrogénèse de nombreux tissus ou organes avec un premier résultat dans le poumon (Gasse et al., 2007). Par la suite, plusieurs modèles de dommages hépatiques chez l'animal ont montré son implication dans la fibrose hépatique (Dixon et al., 2013; Gieling et al., 2009; Petrasek et al., 2012; Wree et al., 2014). Dans le foie, l'inflammasome est majoritairement exprimé par les macrophages résidents du foie, les cellules de Kupffer, et par les monocytes recrutés et différenciés lors de la phase précoce inflammatoire d'une pathologie hépatique (Boaru et al., 2012; Miura et al., 2010; Negash et al., 2013; Seki et al., 2001). Il a été observé que les macrophages hépatiques interagissent avec les CEF dans les zones fibrotiques (Liu et al., 2010).

La déplétion des macrophages permet de diminuer les niveaux de fibrose dans de nombreux modèles de fibrose hépatique (Adachi et al., 1994; Duffield et al., 2005; Ide et al., 2005; Pradere et al., 2013; Rivera et al., 2001, 2007; Sunami et al., 2012). Cependant la fonction des macrophages est complexe et très hétérogène. Ainsi les macrophages peuvent exercer, en fonction du microenvironnement, des effets pro-fibrotiques, avec une activation paracrine des CEF, ou bien servir au contraire à favoriser la résolution de la fibrose hépatique (Duffield et al., 2005).

L'activation de l'inflammasome dans le foie semble jouer un rôle à la fois pro-inflammatoire et pro-fibrotique, mais il n'est pas encore bien établi si ces effets sont liés à des mécanismes directs ou indirects. Nous avons mis au point plusieurs modèles de co-culture pour étudier les interactions entre des macrophages et des CEF humains. L'activation de l'inflammasome était induite après stimulation par 0,1 µg/mL de LPS et 300 µg/mL de cristaux d'acide urique pendant 18 et 6 heures respectivement, en accord avec des travaux précédemment réalisés (Gicquel et al., 2015). Nous avons évalué par q-PCR l'impact de cette activation sur l'état d'expression de la balance MMP/TIMP, sur l'expression de cytokines et chimiokines inflammatoires, et sur l'expression de marqueurs pro-fibrotiques par les CEF.

Article 2 : « *Influence of inflammasome-activation in macrophages on fibrogenic activities of human hepatic stellate cells* »



## 2- Résumé des principaux résultats

Nous avons tout d'abord observé une augmentation de l'expression de l'IL-1 $\beta$  par les cellules THP-1 différenciées et traitées à la fois par du LPS et des cristaux de MSU. La libération d'IL-1 $\beta$  dans le milieu de culture était également augmentée et nous avons montré qu'elle était dépendante de l'activation de l'inflammasome puisque l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la caspase-1, le Z-YVAD-FMK permet de réduire les niveaux de cette cytokine. En revanche, dans les mêmes conditions d'activation, une augmentation significative de la libération d'IL-1 $\beta$  par les cellules LX-2 était mesurée, mais bien inférieure à celle des macrophages.

Lors de nos expériences en milieu conditionné ou en inserts de co-culture, nous avons montré que les cellules LX-2 répondent à la présence des macrophages même non activés par une diminution de l'expression des gènes codants pour les marqueurs pro-fibrotiques collagène de type I et l' $\alpha$ -SMA, avec une faible augmentation de l'expression de la MMP-1 et de la MMP-9. Dans ces mêmes conditions, les macrophages provenant de la différenciation de monocytes de sang humain induisent également la diminution de l'expression de l' $\alpha$ -SMA dans les cellules LX-2, mais également celle de la MMP-1 et MMP-3, avec une augmentation de la MMP-9.

Après activation de l'inflammasome, les cellules THP-1 et les MDM entraînent les mêmes effets sur les cellules LX-2. Dans ce cas, une augmentation de l'expression de la MMP-1, de la MMP-3, de la MMP-9, des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6, et des chimiokines IL-8, CXCL1 et CCL2, ainsi qu'une diminution de l'expression de l' $\alpha$ -SMA et du collagène de type I sont mesurés.

Grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-récepteur à l'IL-6, nous avons montré que les effets observés ne sont pas dû à l'action de cette cytokine. En revanche, l'utilisation de l'anakinra et de l'infliximab, ainsi que du Z-YVAD-FMK, a montré que l'IL-1 $\beta$  est responsable de la régulation de la MMP-1, MMP-3, des cytokines et chimiokines, à l'exception du CCL2, et que son action est dépendante de l'activation de l'inflammasome dans les macrophages, et puis que le TNF- $\alpha$  est également induit dans ce modèle et est responsable de la régulation de la MMP-1, de la MMP-9, des cytokines et chimiokines.

Dans les CEF humain en culture primaire, il semble que l'IL-1 $\beta$  soit responsable de la diminution de l' $\alpha$ -SMA et du collagène de type I observée dans les cellules LX-2.

**Influence of the activation of the inflammasome pathway in macrophages on fibrogenic activities of human hepatic stellate cells.**

Sacha Robert<sup>1\*</sup>, Thomas Gicquel<sup>1</sup>, Aude Bodin<sup>1</sup>, Alain Fautrel<sup>1,2</sup>, Emiliano Barreto<sup>1,3</sup>, Vincent Lagente<sup>1</sup>, Elisabeth Boichot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR991 INSERM, Université de Rennes 1, Rennes, France

<sup>2</sup>Plateforme d'histopathologie H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>, Université de Rennes 1, Rennes, France

<sup>3</sup>Laboratory of Cell Biology, Federal University of Alagoas, Maceió-AL, Brazil.

\*Corresponding author

E-mail: sacharobert35@gmail.com

In preparation

## ABSTRACT

Inflammasome pathways are protein complexes responsible for IL-1 $\beta$  maturation and release by immune cells in response to damages or pathogens. Inflammasomes have been reported to be involved in several models of hepatic fibrosis but the mechanisms by which these complexes drive the fibrogenic status in the liver remain unclear. Two mechanisms could be proposed. The direct pathway consist in the activation of matrix producing cells, myofibroblasts, by damages signals, and the indirect pathway consist in damages-induced activation of immune cells with IL-1 $\beta$ -mediated activation of myofibroblasts. In this study, we conducted co-cultures of differentiated immune cells, macrophages consisting of THP-1 cell line or human monocyte-derived macrophages (MDM), with human hepatic stellate cells (HSC), the LX-2 cell line or primary human myofibroblasts. During co-cultures, with conditioned medium (CM) or inserts, the inflammasome was activated in macrophages using lipopolysaccharide (LPS) associated with monosodium urate (MSU) crystals, and HSC responses were analyzed. Our results show that, no matter the use of either CM or inserts, co-cultures of HSC with basal THP-1 cells drive the negative mRNA regulation of pro-fibrotic markers collagen type I  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA), with small upregulation of the metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 gene expression. Basal MDM, which are more physiological and less inflammatory than THP-1 cells, also drive  $\alpha$ -SMA gene downregulation, but also MMP-1 and MMP-3, with upregulation of MMP-9 gene expression. However, following inflammasome pathway activation, the phenotype observed in HSC were the same in THP-1 cell line or MDM, and consisted in the upregulation of MMP-1, MMP-3, MMP-9, pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and chemokines CXCL8/IL-8, CXCL1/GRO $\alpha$ , and CCL2/MCP-1, and the downregulation of  $\alpha$ -SMA and collagen type I  $\alpha$ 1. We identified the implication of two cytokines ; (i) IL-1 $\beta$  which was responsible of MMP-1, MMP-3, and also cytokines/chemokines, excepting CCL2/MCP-1, mRNA regulation, (ii) and TNF- $\alpha$  for MMP-1, MMP-9 and cytokines/chemokines mRNA regulation. However, we did not find any IL-6 implication. Also, primary cells reveal that general inflammatory environment is responsible of the downregulation of pro-fibrotic markers. Overall, our results suggest that inflammasome pathway activation in macrophages lead to a pro-inflammatory environment for HSC which enhance fibrolytic properties, cytokines and chemokines levels and promote a less myofibroblastic activity of HSC, supporting the indirect role of inflammasome-mediated liver fibrosis, mostly through IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  release.

## INTRODUCTION

Fibrogenesis is a common widespread pathophysiological response in many tissues after chronic or repetitive injury including infections, autoimmune reactions, and mechanical injury [1–3]. The initial insults can be amplified by an inflammatory response leading to fibrosis, deposition of extracellular matrix, scar formation, and organ failure [3]. Inflammasomes are a group of protein complexes that recognize a diverse set of inflammation-inducing stimuli that include pathogen-associated molecular patterns (PAMP) and damage-associated molecular patterns (DAMP) and that control activation of the proteolytic enzyme caspase-1, which in turn regulates maturation of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18 [4,5]. Among the inflammasomes, NOD-like receptor (NLR) protein (NLRP)3 is described to be the most important, and need the adaptor apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) to be activated with caspase-1.

Inflammasome has been involved in fibrogenesis process in different diseases and tissues. It has been reported to contribute to lung fibrosis [6], and also in several models of liver fibrosis. For example, in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)- or thioacetamide (TAA)-induced liver fibrosis in NLRP3- or adaptor ASC-deficient mice, the levels of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 and collagen type I  $\alpha$ 1 were strongly reduced [7]. In another major study using the Lieber-DeCarli's alcoholic liver disease model in mice, the lack of caspase-1 was associated with less fibrotic areas in histological analysis, reduced expression of TGF- $\beta$ 1 and procollagen I  $\alpha$ 1, and also reduced serological levels of amino terminal propeptide of type III procollagen, a non-invasive marker of fibrosis, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1, and hyaluronic acid [8].

The liver contains both parenchymal (hepatocytes) and immune cells (macrophages, neutrophil leukocytes, dendritic cells (DC), T cells, NK/NKT cells, B lymphocytes), where hepatocytes represent the majority of the cell populations. Innate immune cells, including monocytes, macrophages, neutrophils, and DC, express inflammasomes and there is evidence that inflammasomes are functionally active in non-immune cells, including hepatocytes [9–14], hepatic stellate cells (HSC) [13,15], endothelial cells [13,16,17], and myofibroblasts [18]. HSC express components of the inflammasome and activation of primary mouse stellate cells or LX-2 HSC cells with monosodium urate (MSU) crystals resulted in increased TGF- $\beta$  and collagen type I expression, actin reorganization, and inhibition of HSC chemotaxis in an NLRP3-dependant manner [15].

However, the liver resident macrophages, KC, produce significant amounts of IL-1 $\beta$  [19] and express most of the NLR. They are identified as the main source of lipopolysaccharide (LPS)-induced IL-1 $\beta$  and IL-18 [20,21], and caspase-1 deficient KC were not able to secrete mature IL-1 $\beta$  or IL-18 upon LPS stimulation [22].

The interaction of HSC with pro-inflammatory cells such as KC is a crucial event in HSC activation and fibrosis process [23–26], where the migration of macrophages is an important component of the hepatic wound healing process that promotes activation of HSC and extra cellular matrix (ECM) deposition. Indeed, it has been reported that KC and myofibroblasts are co-localized in portal areas and fibrotic septa, suggesting cooperation between these cells [42].

IL-1 $\beta$  exerted its effects through paracrine signaling, which is considered to be the primary mode of interaction between immune cells and parenchymal cells in the liver [27–29]. During experimental liver fibrosis, IL-1 levels are elevated, and there is significantly less liver fibrosis in IL-1R deficient mice [7]. In this situation, the expression of matrix metalloproteinases (MMP) and TIMP are modulated by IL-1, contributing to the modification of fibrosis and tissue remodeling [7].

The exact mechanisms by which IL-1R signaling promotes fibrosis and the cell type(s) that produce(s) IL-1 $\beta$  are yet to be fully defined. Another important question is whether the pro-fibrogenic effects of inflammasome activation, and IL-1 $\beta$  signaling, are due to direct activation of matrix producing cells such as myofibroblasts by DAMP, or if the effects are due to DAMP-induced activation of immune cells such as macrophages with IL-1 $\beta$ -mediated activation of myofibroblasts. To investigate this question, we have conducted co-cultures of differentiated macrophages (THP-1 cell line or human monocyte-derived macrophages) with human hepatic fibroblasts (LX-2 cell line or primary human HSC), in which activation of inflammasome in macrophages is induced by LPS and MSU crystals treatments.

Our results demonstrate that activation of inflammasome in macrophages lead to a pro-inflammatory environment for HSC which enhance MMP expression, cytokines and chemokines levels, but also promote less myofibroblastic activity of HSC, mostly through inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  and also TNF- $\alpha$  release, supporting indirect role of inflammasome-mediated liver fibrosis, but also giving a more complex role of inflammatory signaling.

In preparation

## MATERIALS AND METHODS

### *Reagents*

Recombinant human (rh) granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was purchased from R&D Systems (Abingdon, UK). LPS from *E. coli* 055:B5, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Thiazolyl Blue (MTT), gelatin solution and Nycodenz were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Z-YVAD-FMK was purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Tocilizumab were obtained from Roche (Boulogne-Billancourt, France), Infliximab from MSD (Courbevois, France) and Anakinra from Swedish Orphan Biovitrum (Levallois-Perret, France). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) cell culture media, Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium 1640, antibiotics, L-glutamine, sodium pyruvate, trypsin-EDTA and HEPES were purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA). Fetal calf serum (FCS) was from Lonza (Levallois, France). Acrylamide, SDS, Tris, and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Eurobio (Les Ulis, France). MSU crystals were prepared by recrystallization from uric acid, as previously described [30].

### *Crystal preparation*

MSU crystals were prepared by recrystallization from uric acid, as previously described [30]. Briefly, MSU crystals were obtained by dissolving 1.68 mg in 0.01 M NaOH preheated to 70°C (pH 7.1-7.2). The solution was slowly and continuously agitated at room temperature until crystals formed. The crystals were washed twice with 100% ethanol, dried, autoclaved, and weighed under sterile conditions. Immediately prior to experiments, the crystals were resuspended in phosphate buffered saline (PBS), sonicated and examined under phase microscopy.

### *Cell culture*

THP-1 cells were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 50 UI/mL Penicillin, 50 µg/mL Streptomycin, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. THP-1 cells were differentiated by treatment with 10 ng/mL PMA for 3 days, followed by 24 hours without PMA in RPMI 1640 medium supplemented with 2% FCS before treatments.

LX-2 cells were provided by S.L. Friedman (Mount Sinai School of Medicine, New York, NY) [31] and maintained in DMEM medium supplemented with 10% FCS, 50 IU/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate at 37°C, in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. The cells were used in experiments from passage 16 to passage 26.

Primary human MDM were obtained after differentiation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from buffy-coat donor (Etablissement Français du Sang, Rennes, France) as previously published [32]. The research protocol was conducted under French legal guidelines. Monocytes from healthy donors were enriched using a human CD14 Microbeads separation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Human macrophages were obtained after differentiation from monocytes by incubation with 50 ng/mL rhGM-CSF in RPMI medium supplemented with 10% FCS, 50 IU/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine and 0.1 mM HEPES for 7 days.

Primary human HSC were isolated from histologically normal biopsy specimens after partial hepatectomy in adult patients undergoing hepatic resection for liver metastases, as previously described [33]. Access to the biopsy material was in agreement with French laws and satisfied the requirements of the Ethics Committee of the institution. Dissociation of the liver was performed by perfusion with a pronase and collagenase solution by the company Biopredic International (Rennes, France). HSC purification was performed from the first supernatant of liver perfusion enriched in non-parenchymal cells after hepatocyte isolation. It relies on particular properties of HSC naturally rich in Vitamin-A, which allow their purification by a single-step density-gradient centrifugation with Nycodenz. For this, the supernatant was centrifugated and the pellet was re-suspended with 7 mL of final volume of cold Grey's balanced salt solution (GBSS), and added with 5 mL of calcium-free GBSS + Nycodenz 29%. After mixing of the tube, 1 mL of calcium-free GBSS + BSA 0.3% was gently placed on the cell suspension surface. The tube was then centrifugated for 15 min at 1400 g, to allow HSC collection at the interface between Nycodenz and BSA, whereas other resident cell types fell to the bottom of the tube. Finally, HSC were washed once in GBSS and seeded on tissue-culture dishes treated by vacuum gas plasma (BD Falcon™, USA) in the same medium as LX-2 cells. HSC primary cultures were maintained at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator with passage every 20-25 days. Purification and culture on plastic dishes is known to spontaneously initiate HSC activation [34].



### *Treatments*

Non-adherent THP-1 cells or PBMC were seeded at  $1.10^5$  cells per cm<sup>2</sup> before differentiation. LX-2 cells were seeded at  $3.10^4$  cells per cm<sup>2</sup> and grown in DMEM supplemented with 10% FCS until confluence is reached and then medium is changed by new medium supplemented with 2% FCS for 24 hours. After that time, cells were primed for 18 hours with or without LPS (100 ng/mL) overnight. MSU crystals were added for 6 hours with or without one hour pre-treatment with Z-YVAD-FMK (caspase-1 specific inhibitor).

### *Co-cultures and conditioned medium studies*

Two types of co-cultures were conducted in a mix of 20% DMEM and 80% RPMI 1640 medium supplemented with 2% FCS (determined after MTT cytotoxicity assay). First method used conditioned media (CM) of differentiated THP-1 cells or differentiated PBMC treated with or without LPS for 18 hours, followed by MSU crystals for 6 hours, with or without 1 hour pre-treatment with Z-YVAD-FMK, then supernatant were removed, centrifuged for 10 minutes at 10000 rpm to allow MSU crystals and remains eliminations, and put on LX-2 cells or HSC, which were pre-treated or not with Anakinra (IL-1R antagonist), Tocilizumab (monoclonal antibody anti-IL-6R) or Infliximab (monoclonal antibody anti-TNF- $\alpha$ ) for 1 hour. After 24 hours of contact with CM, LX-2 cells or HSC were harvested. For the second method, THP-1/LX-2 co-cultures were conducted using 6-well plates and 1- $\mu$ m pore size Transwell inserts (BD Biosciences), which allow diffusion of media components but prevent cell migration. The LX-2 cells were plated on the bottom, and the THP-1 cells were plated and differentiated on the insert. After differentiation, inserts containing THP-1 were placed on LX-2 cells, which were pre-treated for 1 hour with or without Tocilizumab or Anakinra, and fill with the same medium with or without LPS to create a gravity gradient of the released mediators. A 3:1 ratio of macrophages/fibroblasts was chosen, because this was considered to represent the physiological ratio in the liver. After 18 hours of incubation with LPS, MSU crystals were added, with or without 1 hour pre-treatment of THP-1 cells with Z-YVAD-FMK. LX-2 cells were harvested 24 hours after MSU crystals stimulation of THP-1 cells.

### *MTT cytotoxicity assay*

Cytotoxicity of LX-2 cells regarding THP-1 cells medium and cytotoxicity of THP-1 cells regarding LX-2 cells medium were evaluated using the MTT assay. Cells were plated in 24-

wells plate until confluence of LX-2 cells or differentiation of THP-1 cells with PMA and 24 hours resting in medium supplemented with 2% FCS. Different mix of DMEM and RPMI 1640 medium were prepared (100/0 - 80/20 - 60/40 - 40/60 - 20/80 - 0/100) and 500  $\mu$ L of medium were incubated with cells for 24, 48 or 72 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. Medium was changed every 24 hours and after each time points, a new medium supplemented with 0.5 mg/mL MTT under sterile conditions was replaced. After 2 hours incubation at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator, the cells were washed with PBS and 500  $\mu$ L of dimethylsulfoxide (DMSO) were placed into each well. Each condition was read in triplicate manner with a microplate reader (POLARstar Omega, BMG LABTECH, Champigny sur Marne, France) at the absorbance of 540 nm.

#### *Extraction of total RNA and real-time PCR*

Total RNA was isolated from cells using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA). RNA quantity and purity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France). Total RNA (1  $\mu$ g) was reverse-transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time quantitative RT-PCR was performed with the fluorescent dye SYBR Green methodology using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the 7900HT fast real-time PCR system (Applied Biosystems). Primer pairs for each transcript were chosen with IDT software <http://eu.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/> and “blasted” with NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Amplification curves were read with SDS 2.3 software (Applied Biosystems) using the comparative cycle threshold method. The steady-state mRNA level for each gene of interest was normalized against GAPDH mRNA.

#### *Gelatinase activities (MMP-2 and MMP-9) assays*

CM were collected and stored at -80°C until use. The enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9 into the supernatant was determined by SDS-PAGE gelatin zymography. Gelatinases present in the supernatant degrade the gelatin matrix, leaving a clear band after staining the gel for proteins. Briefly, 15  $\mu$ L of supernatant were denatured in the absence of a reducing agent and electrophoresed in 7.5% SDS-PAGE containing 0.1% gelatin. The gels were incubated twice in the presence of 2.5% Triton X-100 at room temperature for 10 min, washed twice in distilled water for 20 min, and then incubated at 37°C overnight in a buffer containing 6.62 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> and 50 mM Tris (pH 8). Thereafter, the gels were

stained with 0.1% Coomassie Blue, and proteolysis was detected as a white band against a blue background. The activity of MMP-2 and MMP-9 was determined by densitometric scanning of the bands and analysis using ImageJ software (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

#### *ELISA assay*

CM were collected and stored at -20°C until use. The production of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL8/IL-8, CXCL1/GRO $\alpha$  and pro-collagen I  $\alpha$ 1 was measured in the supernatant using a Duoset® ELISA kit (R&D Systems), according to the manufacturer's procedure. Briefly, CM were added to plates coated with the capture antibody and incubated at room temperature for 2 hours, followed by incubation with biotinylated antibody. Streptavidin-conjugated horseradish-peroxidase was added to the plates, and the enzyme activity after the addition of substrate was detected with an ELISA microplate reader (POLARstar Omega, BMG LABTECH, Champigny sur Marne, France). The ELISA's sensitivity for human IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL8/IL-8, CXCL1/GRO $\alpha$  and pro-collagen I  $\alpha$ 1 were 3.91-250, 9.375-600, 15.6-1000, 31.25-2000, 31.25-2000 and 31.25-2000 pg/mL, respectively.

#### *$\alpha$ -SMA immunostaining*

HSC were seeded into Lab-Tek® II chamber slide™ (Dominique Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France) and cultured for 2 days. Cells were washed by phosphate buffered saline (PBS) and fixed in formaldehyde 4%, 4°C for 30 minutes and re-washed three-times with PBS. Cells were permeabilized by saponine 0.05% in PBS for 30 minutes. Immunohistochemical staining was performed on the Discovery XT automated IHC stainer using the Ventana DABMap detection kit (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland). Detection kit procedure was optimized on the Discovery instrument and was preset. Applications of the Ventana High Temperature Liquid Coverslip (Roche Diagnostic) occurred throughout the automated protocol as appropriate. Likewise, the slides were rinsed between steps with Ventana Tris Based Reaction buffer (Roche diagnostic). Endogen peroxidase was blocked with inhibitor-D 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 4 minutes, at 37°C. After rinsing, slides were incubated at 37°C for 32 minutes with a 1/500 dilution mouse anti  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) (dakocytomation, Denmark). Signal enhancement was carried out using the Ventana DABMap kit (Roche diagnostic) with Biotinylated horse anti mouse immunoglobulin G (H+L)

(Vector laboratory, Burlingame, CA, USA). Slides were counterstained for 4 minutes with haematoxylin and rinsed. After removal from the instrument, slides were manually deshydrated and coverslipped. Images were captured using a scanner and the NIS - Elements AR 4.00.03 software (Nikon, Paris, France).

### *Statistical analysis*

The results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Intergroup differences in treatment effects were probed with a one-way analysis of variance with Tukey's *post-hoc* test (for the comparison of more than two groups). The significance of differences between the groups for other parameters was determined using two-way analysis of variance followed by Bonferroni's *post-hoc* test. All analyses were carried out using Prism software (version 5.0, Graphpad Software, La Jolla, CA, USA). In all analyses, a two-sided *p*-value  $<0.05$  was considered to be statistically significant.

## RESULTS

### ***THP-1 cells, but not LX-2 cells, express a functional NLRP3 inflammasome and release IL-1 $\beta$***

We examined if THP-1 and LX-2 cell lines express inflammasome pathways and could release IL-1 $\beta$  under the activation with LPS and MSU crystals. THP-1 cells particularly expressed NLRP3 inflammasome mRNA among others NLRPs (Fig 1A), whereas LX-2 cells expressed more NLRP1 mRNA when compared to NLRP6 (Fig 1B). In the absence of 0.1  $\mu$ g/mL LPS, THP-1 cells did not induce a significant production of IL-1 $\beta$  after 6 hours stimulation with MSU crystals. In contrast, when primed with LPS for 18 hours, MSU crystals were able to induce significant production of IL-1 $\beta$  (Fig 1C). In THP-1 cells, LPS, but not MSU crystals, was able to induce significant IL-1 $\beta$  mRNA expression (Fig 1D). The release of IL-1 $\beta$  from THP-1 cells after stimulation with 0.1  $\mu$ g/mL LPS and 300  $\mu$ g/mL MSU crystals was significantly reduced after 1 hour treatment with the caspase-1 inhibitor Z-YVAD-FMK prior to MSU crystals addition, in a dose-dependent manner (Fig 1E). LX-2 cells do not release significant amount of IL-1 $\beta$  under basal condition or with MSU crystals or LPS treatments alone, whereas co-stimulation by LPS and MSU crystals induce significant, but moderate release of IL-1 $\beta$  (Fig 1F), around 57-times less than with THP-1 cells treated in the same conditions (Fig 1C).

### ***Conditioned media obtained from THP-1 cells following inflammasome activation induces some changes in gene expression in LX-2 cells, depending on IL-1 $\beta$ , but not IL-6 release***

Conditioned media (CM) obtained from unstimulated THP-1 cells induce in LX-2 cells the upregulated expression of *MMP-1* (Fig 2A) and *MMP-9* (Fig 2C) and the downregulated expression of *COL1A1* (Fig 2D), and *ACTA2* (Fig 2E) compared to control unstimulated LX-2 cells. CM obtained from THP-1 cells stimulated with LPS and MSU crystals induce the upregulation of *MMP-1* (Fig 2A), *MMP-3* (Fig 2B), *MMP-9* (Fig 2C), *IL1B* (Fig 2F), *IL6* (Fig 2G), *CXCL8* (Fig 2H), *CXCL1* (Fig 2I) and *CCL2* (Fig 2J) and the downregulation of *COL1A1* (Fig 2D), and *ACTA2* (Fig 2E) when compared to LX-2 cells treated with CM obtained from unstimulated THP-1 cells. The effects induced on *MMP-1* (Fig 2A), *MMP-3* (Fig 2B), *IL1B* (Fig 2F), *IL6* (Fig 2G), *CXCL8* (Fig 2H) and *CXCL1* (Fig 2I) by CM obtained from THP-1 cells stimulated with LPS and MSU crystals were partially abrogated with one hour pre-treatment with Anakinra of LX-2 cells before CM stimulation. Pre-treatment of LX-

2 cells with Tocilizumab failed to limit the effects of CM obtained from LPS and MSU crystals-stimulated THP-1 cells.

The results indicate that mediators released by THP-1 cells, following inflammasome activation, drive pro-inflammatory, anti-fibrotic and enhanced ECM degradation properties in LX-2 cells, which are partially dependent of IL-1 $\beta$ , but not IL-6 release.

***Conditioned media obtained from THP-1 cells following inflammasome activation induces some changes in gene expression in LX-2 cells, depending on TNF- $\alpha$  release and inflammasome activation***

CM obtained from unstimulated THP-1 cells induces in LX-2 cells the upregulated expression of *MMP-1* (Fig 3A), *MMP-9* (Fig 3C) and *CCL2* (Fig 3J) and the downregulated expression of *COL1A1* (Fig 3D), and *ACTA2* (Fig 3E) compared to unstimulated LX-2 cells. CM obtained from THP-1 cells stimulated with LPS and MSU crystals induces the upregulation of *MMP-1* (Fig 3A), *MMP-3* (Fig 3B), *MMP-9* (Fig 3C), *IL1B* (Fig 3F), *IL6* (Fig 3G), *CXCL8* (Fig 3H), *CXCL1* (Fig 3I) and *CCL2* (Fig 3J) and the downregulation of *COL1A1* (Fig 3D), and *ACTA2* (Fig 3E) when compared to LX-2 cells treated with CM obtained from unstimulated THP-1 cells. The effects induced on *MMP-1* (Fig 3A), *MMP-3* (Fig 3B), *IL1B* (Fig 3F), *IL6* (Fig 3G), *CXCL8* (Fig 3H) and *CXCL1* (Fig 3I) by CM obtained from THP-1 cells stimulated with LPS and MSU crystals were partially abrogated with pre-treatment of THP-1 cells, one hour before MSU crystals stimulation, with Z-YVAD-FMK. Pre-treatment of LX-2 cells with Infliximab abrogated the effects of LPS and MSU crystals-stimulated THP-1 cells CM on the expression of *MMP-1* (Fig 3A), *MMP-9* (Fig 3C), *IL1B* (Fig 3F), *IL6* (Fig 3G), *CXCL8* (Fig 3H) and *CXCL1* (Fig 3I) on LX-2 cells. The co-pre-treatment of THP-1 cells with Z-YVAD-FMK and LX-2 cells with Infliximab abrogated the expression of *MMP-1* (Fig 3A), *MMP-3* (Fig 3B), *MMP-9* (Fig 3C), *IL1B* (Fig 3F), *IL6* (Fig 3G), *CXCL8* (Fig 3H), *CXCL1* (Fig 3I) and *CCL2* (Fig 3J).

The results indicate that the response of LX-2 cells following incubation with CM obtained from activated THP-1 cells, after inflammasome activation, are partially dependent of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  release. However anti-fibrotic effects are still independent from these mediators.

***Co-culture of LX-2 cells with THP-1 cells inducing changes in gene expression is dependent of IL-1 $\beta$  release***

Co-culture of LX-2 cells with unstimulated THP-1 cells induce in LX-2 cells the upregulated expression of *MMP-1* (Fig 4A), *MMP-9* (Fig 4C), *IL1B* (Fig 4F), *IL6* (Fig 4G), *CXCL8* (Fig 4H), *CXCL1* (Fig 4I) and *CCL2* (Fig 4J) and the downregulated expression of *COL1A1* (Fig 4D), and *ACTA2* (Fig 4E) compared to non-co-cultured LX-2 cells. Co-culture of LX-2 cells with THP-1 cells stimulated with LPS and MSU crystals induce the upregulation of *MMP-1* (Fig 4A), *MMP-3* (Fig 4B), *MMP-9* (Fig 4C), *IL1B* (Fig 4F), *IL6* (Fig 4G), *CXCL8* (Fig 4H), *CXCL1* (Fig 4I) and *CCL2* (Fig 4J) and the downregulation of *COL1A1* (Fig 4D), and *ACTA2* (Fig 4E) when compared to LX-2 cells in co-culture with unstimulated THP-1 cells. The induced effects on *MMP-1* (Fig 4A), *MMP-3* (Fig 4B), *IL1B* (Fig 4F), *IL6* (Fig 4G), *CXCL8* (Fig 4H), *CXCL1* (Fig 4I) and *CCL2* (Fig 4J) by co-culture with THP-1 cells stimulated with LPS and MSU crystals were partially reduced under the pre-treatment of LX-2 cells with Anakinra. Pre-treatment of LX-2 cells with Tocilizumab failed to limit the effects of co-culture with THP-1 cells stimulated with LPS and MSU crystals.

The results indicate that co-cultured LX-2 cells with THP-1 cells, following the activation of inflammasome, show pro-inflammatory, anti-fibrotic and enhanced ECM degradation properties, which are partially dependant of IL-1 $\beta$ , but not IL-6 release.

***Co-culture of LX-2 cells with THP-1 cells inducing changes in gene expression is dependent of inflammasome activation in THP-1 cells***

Co-culture of LX-2 cells with THP-1 cells stimulated with LPS and MSU crystals induces the upregulation of *MMP-1* (Fig 5A), *MMP-3* (Fig 5B), *MMP-9* (Fig 5C), *IL1B* (Fig 5F), *IL6* (Fig 5G), *CXCL8* (Fig 5H), *CXCL1* (Fig 5I) and *CCL2* (Fig 5J) and the downregulation of *COL1A1* (Fig 5D), and *ACTA2* (Fig 5E) when compared to LX-2 cells in co-culture with unstimulated THP-1 cells. The effects induced on *MMP-1* (Fig 5A), *MMP-3* (Fig 5B), *IL1B* (Fig 5F), *IL6* (Fig 5G), *CXCL8* (Fig 5H) and *CXCL1* (Fig 5I) by co-culture with THP-1 cells stimulated with LPS and MSU crystals were partially reduced under the pre-treatment of THP-1 cells with Z-YVAD-FMK.

The results indicate that the IL-1 $\beta$ -driven effects observed in co-cultured LX-2 cells with THP-1 cells are dependent of inflammasome activation.

***Conditioned media from Monocytes-differentiated Macrophages induces some changes in gene expression in LX-2 cells and is dependent of IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  release and inflammasome activation, but not on IL-6 release***

CM obtained from unstimulated MDM induce in LX-2 cells the upregulated expression of *MMP-9* (Fig 6C) and the downregulated expression of *MMP-1* (Fig 6A), *MMP-3* (Fig 6B), and *ACTA2* (Fig 6E) compared to unstimulated LX-2 cells. CM obtained from MDM stimulated with LPS and MSU crystals induce the upregulation of *MMP-1* (Fig 6A), *MMP-3* (Fig 6B), *MMP-9* (Fig 6C), *IL1B* (Fig 6F), *IL6* (Fig 6G), *CXCL8* (Fig 6H), *CXCL1* (Fig 6I) and *CCL2* (Fig 6J) and the downregulation of *COL1A1* (Fig 6D), and *ACTA2* (Fig 6E) when compared to LX-2 cells treated with CM obtained from unstimulated differentiated-THP-1 cells. The effects induced on *MMP-1* (Fig 6A), *MMP-3* (Fig 6B), *IL1B* (Fig 6F), *IL6* (Fig 6G), *CXCL8* (Fig 6H), and *CXCL1* (Fig 6I) were reduced by pre-treatment with Anakinra, Z-YVAD-FMK, Infliximab and both Z-YVAD-FMK and Infliximab. The effects induced on *MMP-9* (Fig 6C) and *CCL2* (Fig 6J) were reduced only by pre-treatment with Infliximab and both Z-YVAD-FMK and Infliximab. The effects induced on *COL1A1* (Fig 6D) and *ACTA2* (Fig 6E) were reduced only by pre-treatment with both Z-YVAD-FMK and Infliximab.

The results indicate that inflammasome activation in MDM, elicited pro-inflammatory, anti-fibrotic and enhanced ECM degradation properties in LX-2 cells, which are partially dependent of inflammasome-mediated IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , but not IL-6 release.

***Conditioned media from THP-1 cells induces changes in gene expression in primary human HSC and is dependent of IL-1 $\beta$  release***

Following purification of primary human hepatic stellate cells, which are quiescent cells, we controlled that they were completely differentiated into myofibroblasts by the measurement of the expression of  $\alpha$ -SMA (Fig 7A). CM obtained from THP-1 cells stimulated with LPS and MSU crystals induce the upregulation of *MMP-1*, *MMP-3* and *MMP-9* (Fig 7B), and also of *IL1B*, *IL6*, *CXCL8*, *CXCL1* and *CCL2* (Fig 7D), and the downregulation of *COL1A1* and *ACTA2* (Fig 7C) when compared to primary human HSC treated with CM obtained from unstimulated THP-1 cells. The effects induced on *MMP-1* (Fig 7B), *MMP-3* (Fig 7B), *COL1A1* (Fig 7C), *ACTA2* (Fig 7C), *IL1B* (Fig 7D), *IL6* (Fig 7D), *CXCL8* (Fig 7D), and *CXCL1* (Fig 7D) were reduced under the pretreatment with Anakinra.

The results indicate that mediators released by THP-1 cells, following inflammasome activation, drive pro-inflammatory, anti-fibrotic and enhanced ECM degradation properties in primary human activated HSC, which are partially dependent of IL-1 $\beta$ .



## DISCUSSION

The involvement of inflammasome pathway to liver fibrosis is reported in numerous experimental models [35]. However, the precise mechanism by which inflammasome drives the fibrogenesis is still unknown. The present study investigated the influence of secreted factors obtained in CM or in co-culture model of macrophages (THP-1 cell line or blood monocyte-derived macrophages) and human hepatic myofibroblasts (LX-2 cell line or primary hepatic stellate cells). In a previous work, we investigated the potential of LX-2 cells in fibrogenic and inflammatory responses induced by several cytokines (Robert et al., 2016 - PlosOne, in press, doi:10.1371/journal.pone.0153118). We found out that even if these cells already express the markers of myofibroblastic activation, they are still able to respond toward TGF- $\beta$ 1 stimulation with pro-fibrotic and anti-inflammatory phenotypes. However, direct incubation of these cells with pro-inflammatory mediators IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  or CXCL8/IL-8 elicits an opposite pro-inflammatory phenotype, with also downregulation of the myofibroblastic differentiation marker  $\alpha$ -SMA, and/or the mitogen of HSC, PDGF-BB, and also a pro-fibrolytic response with the upregulation of MMP-1, MMP-3 and MMP-9. These data suggested that activated HSC are important partners of the inflammation process of the liver, contributing to fibrosis resolution or perpetuation through MMP regulation.

The expression of inflammasome proteins can be found in a wide variety of liver cells. Importantly, the liver exhibits high levels of caspase-1 relative to many tissues [12]. In terms of NLR expression, early studies showed that the liver expresses NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP10, NLRP12 and NLRC4 at the mRNA level [36,37]. NLRP1, NLRP3 and AIM2 are expressed in KC, liver sinusoidal endothelial cells, in periportal myofibroblasts and also in HSC, while the expression of these receptors in hepatocytes were only detectable when they were exposed to appropriate inflammatory stimuli [38]. Inflammasomes are present in HSC [13,15]. Myofibroblasts also have been implicated to express inflammasome pathway components [18]. Challenge with LPS drastically increases expression of NLR in cultured HSC suggesting that the activation of inflammasomes is one additional feature that allows HSC to contribute to liver immunology [38]. A previous study has documented that the application of MSU crystals into cultures of LX-2 HSC results in a strong upregulation of TGF- $\beta$ 1 and collagen type I mRNA expression and actin reorganization that was not observed when individual inflammasome components were lacking [15]. Indeed, we found that LX-2 cells express highest mRNA level of NLRP1 than other NLR and AIM2, and also that LPS and MSU crystals co-stimulation of LX-2 cells induce the release of IL-1 $\beta$ . Although, LX-2

cells release poor levels of IL-1 $\beta$  and KC, they were reported to express the highest levels of inflammasome pathway components and IL-1 $\beta$  production in the liver [14,19]. In accordance with this data, our experiments show that differentiated THP-1 cells mostly express NLRP3 among other NLR and AIM2 at mRNA level. Moreover, LPS and MSU crystals co-stimulation elicits an important release of IL-1 $\beta$  which was dependent of the activation of NLRP3-inflammasome pathway since the caspase-1 inhibitor, Z-YVAD-FMK significantly decreased the release of IL-1 $\beta$ , but do not modify the expression of gene under LPS stimulation.

In our study, we used the THP-1 cell line which expresses CD11b, IL-1 $\beta$ , and TLR4 after differentiation with PMA [39]. In addition, these cells have constitutive activation of caspase-1, required for IL-1 $\beta$  processing and secretion, while macrophages require a second stimulus to activate caspase-1 [40]. We also used another population of macrophages derived from human blood monocytes, which has been shown to share some properties with THP-1 cell line [41]. These cells are involved in hepatic inflammatory process and fibrogenesis in which the number of resident KC decreases and monocyte-derived hepatic macrophages are markedly increased [42,43]. The recruitment of these cells is driven by the chemokine CCL2/MCP-1. And it has been previously shown that HSC are the major sources of CCL2/MCP-1, which are activated through TLR4 ligands [23]. Indeed, inhibition of CCL2/MCP-1 in rats or genetic deletion of its receptor CCR2 in mice decreased macrophage infiltration in response to injury and markedly inhibited liver fibrosis [44,45]. Interestingly, our results show that CCL2/MCP-1 is upregulated in response to the co-culture of macrophages with HSC (in cell line and primary cell experiments), with or without activation of inflammasome. But, it is not downregulated after IL-1 $\beta$  inhibition, suggesting another soluble mediator is responsible of its regulation. We found that TNF- $\alpha$  is a good candidate, however it is necessary to also shut down the activation of inflammasome with Z-YVAD-FMK.

Due to their anatomical position in the space of Disse, between the fenestrated endothelium of the sinusoids and the hepatocytes, HSC are optimally located to interact with many cell types in the liver. In the fibrotic liver, macrophages consistently localize closely to activated myofibroblasts in areas of scar tissue [26,46,47]. The interactions between KC and HSC, however, must be considered to be very complex due to heterogeneity in the individual cell populations. While culture activation by itself only partially reproduced the characteristic changes of HSC during liver cirrhosis, the co-culture of HSC with KC more closely resembled the in vivo situation [48], also indicating the relevance of macrophage-HSC

interactions in vivo. Crosstalk between macrophages and liver fibroblasts leads to changes in function and in the patterns of cytokines secreted by both cell types [49,50]. Inflammatory MDM produce TGF- $\beta$  which further stimulates HSC activation [51]. When different monocyte subsets are isolated from patients with hepatic fibrosis, the CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte subset release many inflammatory cytokines and can efficiently activate primary HSC in vitro [52,53]. In another study of co-culture between MDM and fibroblast cell line WI-38, it was shown that M1 macrophages inhibited fibrogenesis environment by releasing anti-fibrogenic or fibrolytic factors, while M2 macrophages enhanced fibrogenesis environment by providing pro-fibrogenic factors [50]. In another co-culture study of M1/M2 polarized macrophages with dermal fibroblasts, secreted factors from M1 macrophages change the phenotype of fibroblasts into a pro-inflammatory state and upregulate the expression of MMP-1, MMP-2, MMP-3 and MMP-14, whereas secreted factors from M2 macrophages does not induce a myofibroblastic activation of fibroblasts but could have a major effect on fibroblasts with an inflammatory phenotype [54]. There is clear evidence from in vitro and in vivo studies that KC can activate HSC for differentiation into myofibroblasts, through paracrine mechanisms, likely involving the potent pro-fibrotic and mitogenic cytokines TGF- $\beta$  and PDGF [48,55]. Interestingly, not only monocytes and macrophages influence HSC differentiation and survival, but HSC also impact on the macrophage phenotype. It was shown that HSC elicit pro-inflammatory response in KC based on the reduced expression of TNF- $\alpha$  and CXCL1/GRO $\alpha$ , and increased or unaltered expression of IL-6 in stellate cell-depleted mice after ischemia/reperfusion of LPS challenge [56]. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  also increase expression of IL-6, which shows autocrine growth-factor activity in fibroblasts. IL-6 is an important mediator of liver fibrosis [57], which is upregulated in activated HSC [58].

CXCL8/IL-8 is strongly activated in chronic liver diseases, thus likely contributing to hepatic inflammation and is associated with neutrophil infiltration [59,60]. Interestingly, CXCL8/IL-8 does not seem to primarily promote neutrophil attraction during fibrogenesis, but rather contributes to accumulation of monocytes in fibrotic livers, as circulating monocytes in patients with cirrhosis significantly upregulate CXCR1, CXCL8/IL-8 receptor, on their surface [59]. CXCL8/IL-8 is induced in cells transfected with the hepatitis C virus core protein and identified as one of the major triggers driving expression of  $\alpha$ -SMA in LX-2 cell line and primary HSC [61]. Accordingly, our findings reveal that in basal condition, THP-1 cell line or MDM are not able to induce a pro-inflammatory state in LX-2 cell line with CM,

probably because LX-2 cells were exposed during a short timing of 24 hours. In contrast, in co-culture of LX-2 cells with THP-1 cells using insert, in basal condition, THP-1 cells were able to induce the mRNA upregulation of IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8/IL-8, CXCL1/GRO $\alpha$  and CCL2/MCP-1, probably because cells share the same medium for 42 hours. Following activation of inflammasome pathway in macrophages, in both CM and insert conditions of co-culture, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were identified to be responsible of the pro-inflammatory state in LX-2 cells and HSC.

Macrophages in the liver can express several MMP, including MMP-9, MMP-12 and MMP-13, that are involved in matrix degradation and thereby favor resolution of liver injury and fibrosis [46,62]. However, it has also been shown that MMP-9 is required for the activation of TGF- $\beta$  [63]. Following activation of inflammasome pathway, we showed upregulation of mRNA for MMP-1, MMP-3 and MMP-9 in LX-2 cells and HSC. We also observe a release of IL-1 $\beta$  probably responsible for the upregulation of MMP-3, and TNF- $\alpha$  for the upregulation of MMP-9 mRNA levels. MMP-1 mRNA regulation seems to be dependent of both IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  releases, suggesting a more indirect signaling for this gene.

In this work, we show that in vitro activation of inflammasome in macrophages give an anti-fibrotic phenotype to HSC, with downregulation of the mRNA expression levels of  $\alpha$ -SMA and collagen type I  $\alpha$ 1. However, it was unclear if these effects were dependent of IL-1 $\beta$  and/or TNF- $\alpha$  because Anakinra, Z-YVAD-FMK or Infliximab pretreatment failed to significantly reduce the effects in LX-2 cells, whereas Anakinra pretreatment in primary human HSC was effective. This result is consistent with the overexpression of MMP, but is divergent to in vivo experiments in which inflammasome inactivation or M1 pro-inflammatory environment drives the development of fibrosis.

In conclusion, our study reports the complex interaction observed in the liver between pro-inflammatory macrophages and HSC in which direct paracrine signals seems to be active during early phases of injury, but also in which some indirect mechanisms create a link between inflammation and fibrogenesis. In favor of indirect pro-fibrotic role of the activation of inflammasome pathway and the release of IL-1 $\beta$ , it was shown that macrophage-induced activation of NF- $\kappa$ B in HSC in vitro and in vivo was mediated by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  did not promote HSC activation but promoted survival of activated HSC in vitro and in vivo and thereby increased liver fibrosis, as demonstrated by neutralization in co-culture experiments. Co-culture and in vivo ablation experiments revealed only a minor

contribution to NF- $\kappa$ B activation in HSC by DC, and no contribution of DC to liver fibrosis development, respectively [55]. Another indirect mechanism is that inflammation also causes damages in the liver resulting in apoptosis of cells.

In preparation

1. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*. 2007;117: 524–529. doi:10.1172/JCI31487
2. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3: 349–363. doi:10.1038/nrm809
3. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25: 195–206. doi:10.1016/j.bpg.2011.02.005
4. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140: 821–832. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
5. Davis BK, Wen H, Ting JP-Y. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011;29: 707–735. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101405
6. Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulin N, Charron S, Schnyder-Candrian S, et al. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 2007;117: 3786–3799. doi:10.1172/JCI32285
7. Gieling RG, Wallace K, Han Y-P. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296: G1324–1331. doi:10.1152/ajpgi.90564.2008
8. Petrasek J, Bala S, Csak T, Lippai D, Kodys K, Menashy V, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J Clin Invest*. 2012;122: 3476–3489. doi:10.1172/JCI60777
9. Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology*. 2011;54: 133–144. doi:10.1002/hep.24341
10. Burdette D, Haskett A, Presser L, McRae S, Iqbal J, Waris G. Hepatitis C virus activates interleukin-1 $\beta$  via caspase-1-inflammasome complex. *J Gen Virol*. 2012;93: 235–246. doi:10.1099/vir.0.034033-0
11. Yan W, Chang Y, Liang X, Cardinal JS, Huang H, Thorne SH, et al. High-mobility group box 1 activates caspase-1 and promotes hepatocellular carcinoma invasiveness and metastases. *Hepatology*. 2012;55: 1863–1875. doi:10.1002/hep.25572
12. Paszkowski AS, Rau B, Mayer JM, Möller P, Beger HG. Therapeutic application of caspase 1/interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme inhibitor decreases the death rate in severe acute experimental pancreatitis. *Ann Surg*. 2002;235: 68–76.
13. Masumoto J, Taniguchi S, Nakayama J, Shiohara M, Hidaka E, Katsuyama T, et al. Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin N-terminal homology domain-containing protein, in normal human tissues. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. 2001;49: 1269–1275.
14. Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, Lau DTY, Doehle B, Papic N, et al. IL-1 $\beta$  production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathog*. 2013;9: e1003330. doi:10.1371/journal.ppat.1003330

15. Watanabe A, Sohail MA, Gomes DA, Hashmi A, Nagata J, Sutterwala FS, et al. Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296: G1248–1257. doi:10.1152/ajpgi.90223.2008
16. Kolly L, Busso N, Palmer G, Talabot-Ayer D, Chobaz V, So A. Expression and function of the NALP3 inflammasome in rheumatoid synovium. *Immunology*. 2010;129: 178–185. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03174.x
17. Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, Sutterwala FS, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest*. 2009;119: 305–314. doi:10.1172/JCI35958
18. Rawat R, Cohen TV, Ampong B, Francia D, Henriques-Pons A, Hoffman EP, et al. Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle. *Am J Pathol*. 2010;176: 2891–2900. doi:10.2353/ajpath.2010.090058
19. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, et al. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology*. 2010;139: 323–334.e7. doi:10.1053/j.gastro.2010.03.052
20. Matsui K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Hyodo Y, Hayashi N, Hiroishi K, et al. Propionibacterium acnes treatment diminishes CD4+ NK1.1+ T cells but induces type I T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997;159: 97–106.
21. Imamura M, Tsutsui H, Yasuda K, Uchiyama R, Yumikura-Futatsugi S, Mitani K, et al. Contribution of TIR domain-containing adapter inducing IFN-beta-mediated IL-18 release to LPS-induced liver injury in mice. *J Hepatol*. 2009;51: 333–341. doi:10.1016/j.jhep.2009.03.027
22. Seki E, Tsutsui H, Nakano H, Tsuji N, Hoshino K, Adachi O, et al. Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001;166: 2651–2657.
23. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med*. 2007;13: 1324–1332. doi:10.1038/nm1663
24. Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest*. 1989;84: 1780–1785. doi:10.1172/JCI114362
25. Rivera CA, Bradford BU, Hunt KJ, Adachi Y, Schrum LW, Koop DR, et al. Attenuation of CCl(4)-induced hepatic fibrosis by GdCl(3) treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281: G200–207.
26. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest*. 2005;115: 56–65. doi:10.1172/JCI22675
27. McClain C, Barve S, Joshi-Barve S, Song Z, Deaciuc I, Chen T, et al. Dysregulated cytokine metabolism, altered hepatic methionine metabolism and proteasome dysfunction in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005;29: 180S–8S.

28. Gao B, Seki E, Brenner DA, Friedman S, Cohen JI, Nagy L, et al. Innate immunity in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300: G516–525. doi:10.1152/ajpgi.00537.2010
29. Petrasek J, Dolganiuc A, Csak T, Nath B, Hritz I, Kodys K, et al. Interferon regulatory factor 3 and type I interferons are protective in alcoholic liver injury in mice by way of crosstalk of parenchymal and myeloid cells. *Hepatology*. 2011;53: 649–660. doi:10.1002/hep.24059
30. Gicquel T, Robert S, Loyer P, Victoni T, Bodin A, Ribault C, et al. IL-1 $\beta$  production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2015;29: 4162–4173. doi:10.1096/fj.14-267393
31. Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*. 2005;54: 142–151. doi:10.1136/gut.2004.042127
32. Gicquel T, Victoni T, Fautrel A, Robert S, Gleonnec F, Guezingar M, et al. Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014;41: 279–286. doi:10.1111/1440-1681.12214
33. Rostan O, Robert-Gangneux F, Lambert M, Samson M, Gangneux JP. Human hepatic stellate cells in primary culture are safe targets for *Leishmania donovani*. *Parasitology*. 2013;140: 471–481. doi:10.1017/S0031182012001965
34. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008;88: 125–172. doi:10.1152/physrev.00013.2007
35. Szabo G, Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12: 387–400. doi:10.1038/nrgastro.2015.94
36. Lech M, Avila-Ferrufino A, Skuginna V, Susanti HE, Anders H-J. Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and inflammasome-related mRNAs in humans and mice. *Int Immunol*. 2010;22: 717–728. doi:10.1093/intimm/dxq058
37. Anderson JP, Mueller JL, Rosengren S, Boyle DL, Schaner P, Cannon SB, et al. Structural, expression, and evolutionary analysis of mouse CIAS1. *Gene*. 2004;338: 25–34. doi:10.1016/j.gene.2004.05.002
38. Boaru SG, Borkham-Kamphorst E, Tihaa L, Haas U, Weiskirchen R. Expression analysis of inflammasomes in experimental models of inflammatory and fibrotic liver disease. *J Inflamm Lond Engl*. 2012;9: 49. doi:10.1186/1476-9255-9-49
39. Tiwari RL, Singh V, Singh A, Barthwal MK. IL-1R-associated kinase-1 mediates protein kinase C $\delta$ -induced IL-1 $\beta$  production in monocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011;187: 2632–2645. doi:10.4049/jimmunol.1002526
40. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, van der Meer JHM, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 $\beta$  in monocytes and macrophages. *Blood*. 2009;113: 2324–2335. doi:10.1182/blood-2008-03-146720



41. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2010;5: e8668. doi:10.1371/journal.pone.0008668
42. Holt MP, Cheng L, Ju C. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. *J Leukoc Biol*. 2008;84: 1410–1421. doi:10.1189/jlb.0308173
43. Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, Boulter L, Aucott RL, Ali A, et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109: E3186–3195. doi:10.1073/pnas.1119964109
44. Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology*. 2005;128: 138–146.
45. Mitchell C, Couton D, Couty J-P, Anson M, Crain A-M, Bizet V, et al. Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice. *Am J Pathol*. 2009;174: 1766–1775. doi:10.2353/ajpath.2009.080632
46. Fallowfield JA, Mizuno M, Kendall TJ, Constandinou CM, Benyon RC, Duffield JS, et al. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007;178: 5288–5295.
47. Liu C, Tao Q, Sun M, Wu JZ, Yang W, Jian P, et al. Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2010;90: 1805–1816. doi:10.1038/labinvest.2010.123
48. De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, Brenner DA, et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology*. 2007;132: 1937–1946. doi:10.1053/j.gastro.2007.02.033
49. Bonecchi R, Facchetti F, Dusi S, Luini W, Lissandrini D, Simmelink M, et al. Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000;164: 3862–3869.
50. Song E, Ouyang N, Hörbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol*. 2000;204: 19–28. doi:10.1006/cimm.2000.1687
51. Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C, et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology Baltim Md*. 2009;50: 261–274. doi:10.1002/hep.22950
52. Liaskou E, Zimmermann HW, Li K-K, Oo YH, Suresh S, Stamataki Z, et al. Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. *Hepatology Baltim Md*. 2013;57: 385–398. doi:10.1002/hep.26016
53. Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zerneck A, et al. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes

to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One*. 2010;5: e11049.  
doi:10.1371/journal.pone.0011049

54. Ploeger DT, Hoesly NA, Schipper M, Koerts JA, de Rond S, Bank RA. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell Commun Signal CCS*. 2013;11: 29. doi:10.1186/1478-811X-11-29
55. Pradere J-P, Kluwe J, De Minicis S, Jiao J-J, Gwak G-Y, Dapito DH, et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology*. 2013;58: 1461–1473. doi:10.1002/hep.26429
56. Stewart RK, Dangi A, Huang C, Murase N, Kimura S, Stolz DB, et al. A novel mouse model of depletion of stellate cells clarifies their role in ischemia/reperfusion- and endotoxin-induced acute liver injury. *J Hepatol*. 2014;60: 298–305. doi:10.1016/j.jhep.2013.09.013
57. Natsume M, Tsuji H, Harada A, Akiyama M, Yano T, Ishikura H, et al. Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol*. 1999;66: 601–608.
58. Holt AP, Salmon M, Buckley CD, Adams DH. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis*. 2008;12: 861–882, x. doi:10.1016/j.cld.2008.07.002
59. Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, Nattermann J, Luedde T, Trautwein C, et al. Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS One*. 2011;6: e21381. doi:10.1371/journal.pone.0021381
60. Zimmermann HW, Tacke F. Modification of chemokine pathways and immune cell infiltration as a novel therapeutic approach in liver inflammation and fibrosis. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2011;10: 509–536.
61. Clément S, Pascarella S, Conzelmann S, Gonelle-Gispert C, Guilloux K, Negro F. The hepatitis C virus core protein indirectly induces alpha-smooth muscle actin expression in hepatic stellate cells via interleukin-8. *J Hepatol*. 2010;52: 635–643. doi:10.1016/j.jhep.2009.10.035
62. Pellicoro A, Aucott RL, Ramachandran P, Robson AJ, Fallowfield JA, Snowdon VK, et al. Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. *Hepatology*. 2012;55: 1965–1975. doi:10.1002/hep.25567
63. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Kotliansky V, et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med*. 2001;194: 809–821.

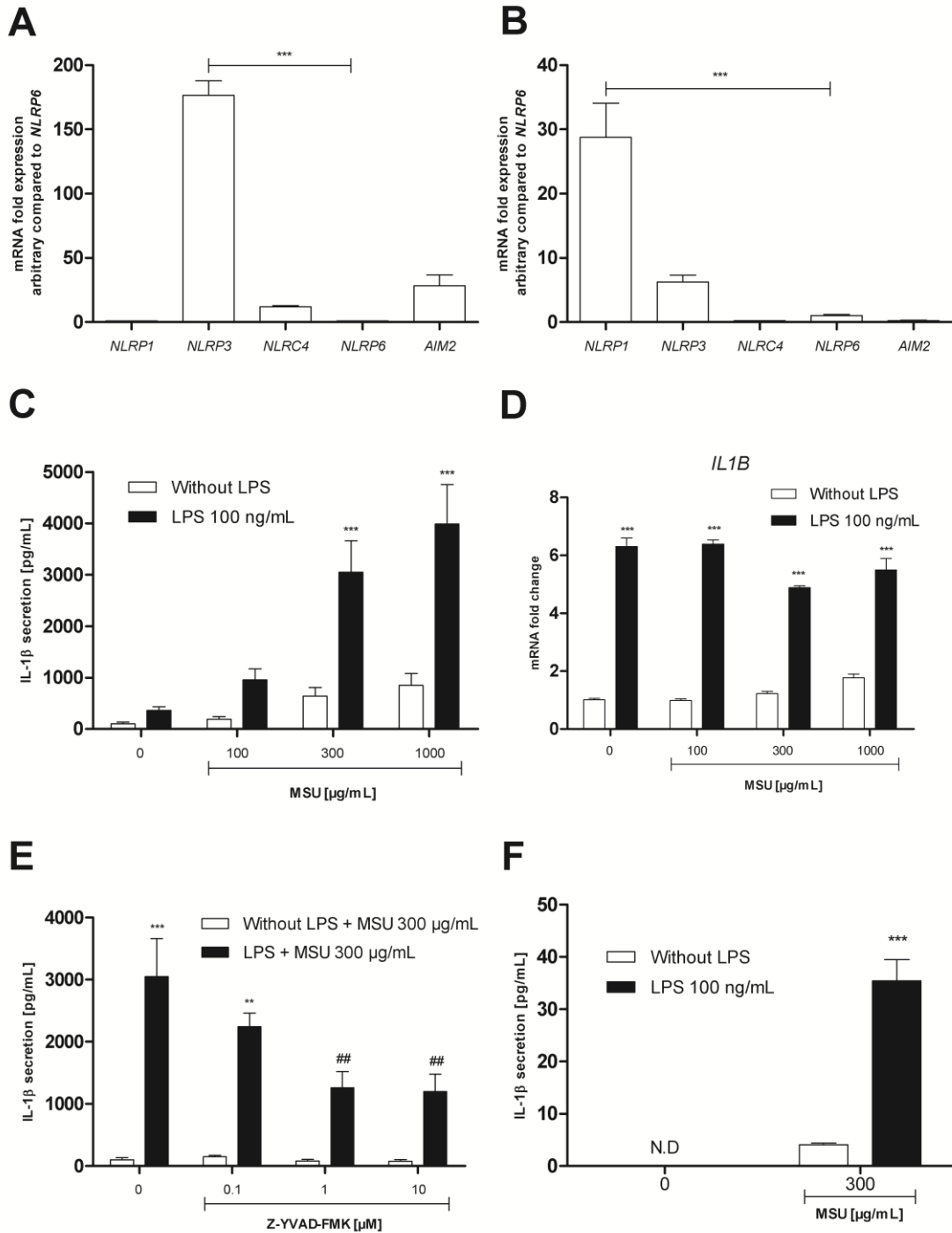
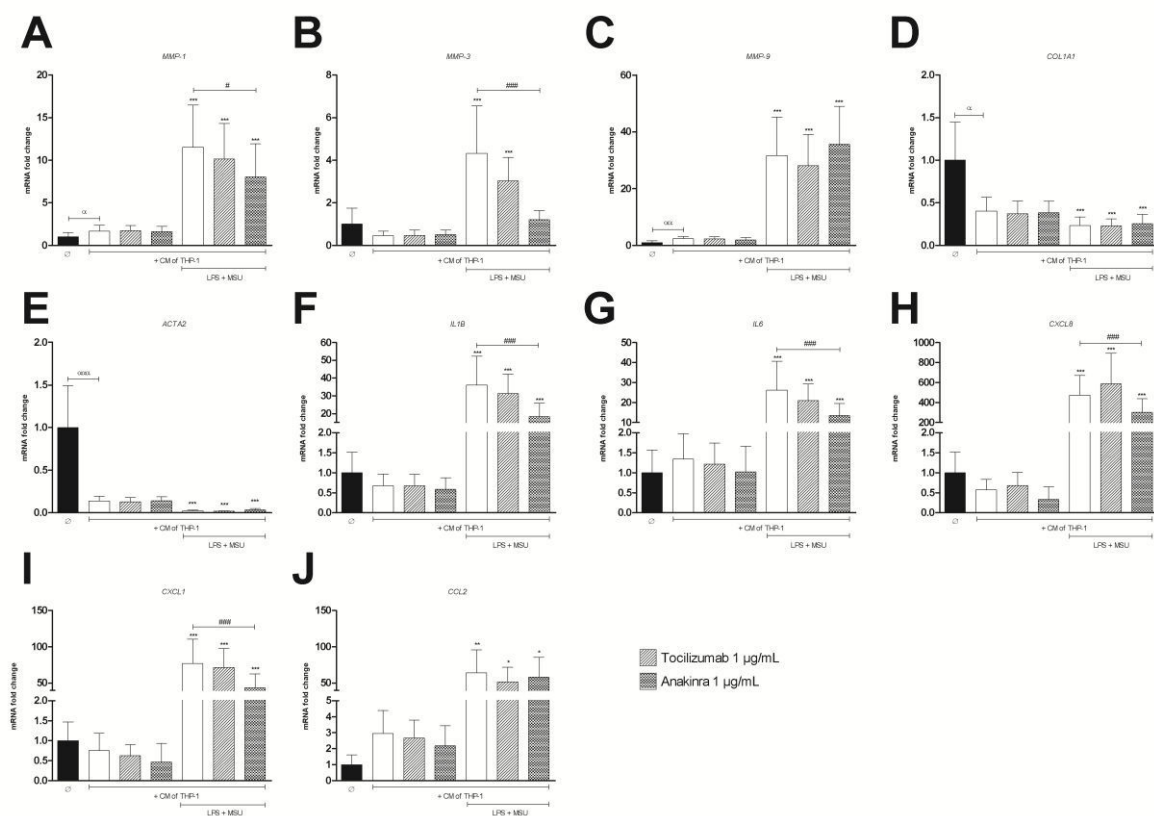
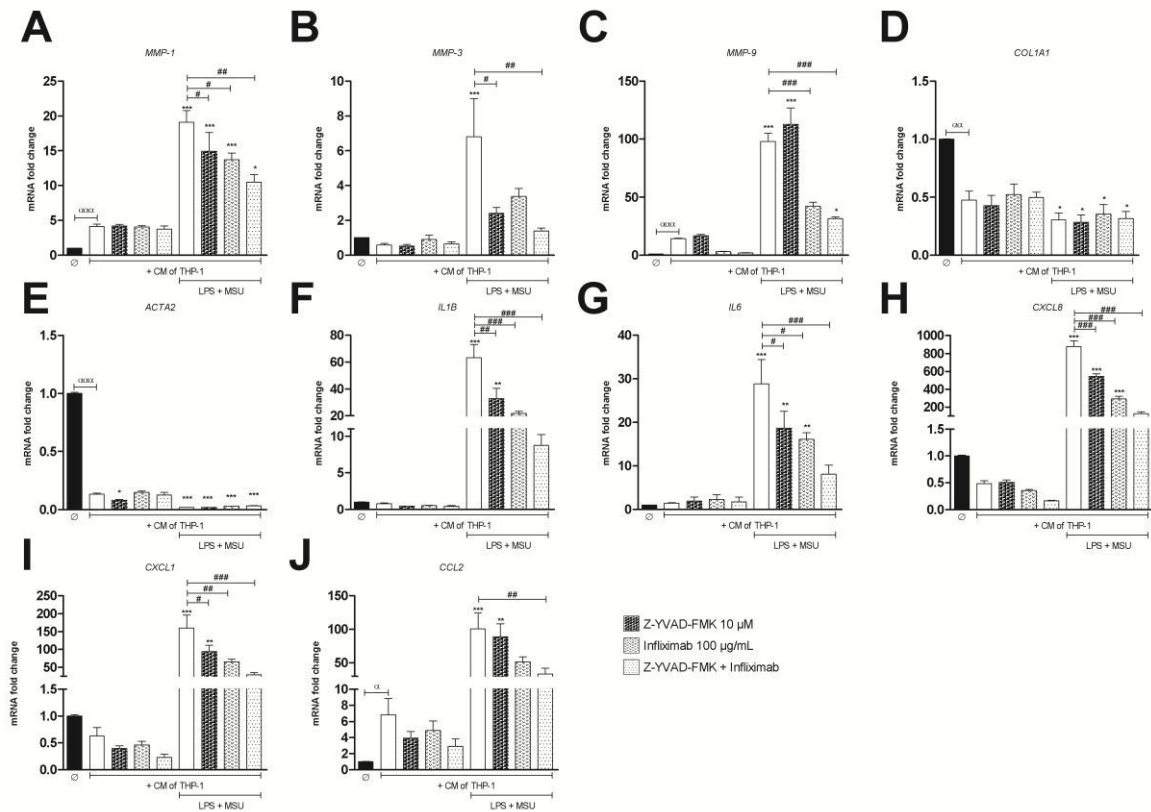


Figure 1 - Compared responses of THP-1 and LX-2 cells under the activation of inflammasome pathway. (A,B) Relative mRNA expression to *NLRP6* of others inflammasome sensor protein genes were evaluated in unstimulated PMA-differentiated THP-1 cells (A) and LX-2 cells (B). (C) PMA-differentiated THP-1 cells were treated for 18 hours with 100 ng/mL LPS followed by 6 hours of MSU crystals (100, 300 and 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Supernatants were collected and IL-1 $\beta$  levels were quantified using ELISA assay. (D) IL-1 $\beta$

mRNA expression levels were measured and normalized against that of GAPDH (using real-time PCR) in PMA-differentiated THP-1 cells treated for 18 hours with 100 ng/mL of LPS followed by 6 hours of increasing concentrations of MSU crystals (100, 300 and 1000  $\mu$ g/mL). **(E)** PMA-differentiated THP-1 cells were treated with or without 100 ng/mL of LPS for 18 hours followed by 6 hours of 300  $\mu$ g/mL of MSU crystals. One hour before MSU crystals stimulation, cells were pre-treated with increasing concentrations of Z-YVAD-FMK (0.1, 1 and 10  $\mu$ M). Supernatant were collected and IL-1 $\beta$  levels were quantified using ELISA assay. **(F)** LX-2 cells were treated for 18 hours with LPS at 100 ng/mL followed by 300  $\mu$ g/mL of MSU crystals for 6 hours. Supernatant were collected and IL-1 $\beta$  levels were quantified using ELISA assay. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , relative to a control. ##  $p < 0.01$  relative to LPS+MSU 300  $\mu$ g/mL condition.



**Figure 2 - Role of IL-6 and IL-1 $\beta$  in cellular response of LX-2 cells with conditioned media from THP-1 cells.** mRNA expression levels of metalloproteinases (MMP)-1 (A), MMP-3 (B), MMP-9 (C), COL1A1/collagen I  $\alpha$ 1 (D), ACTA2/ $\alpha$ -smooth muscle actin (E), IL1B/interleukin-1 $\beta$  (F), IL6/interleukin-6 (G), CXCL8/interleukin-8 (H), CXCL1/GRO $\alpha$  (I), and CCL2/MCP1 (J) were measured and normalized against that of GAPDH (using real-time PCR) in LX-2 cells. LX-2 cells were stimulated 24 hours, or not, with conditioned media (CM) obtained from PMA-differentiated THP-1 cells, in which the inflammasome was activated, or not, with 18 hours of lipopolysaccharide (LPS) at 100 ng/mL followed by 6 hours of 300  $\mu$ g/mL of monosodium urate (MSU) crystals. In some conditions, one hour before MSU crystals stimulation, THP-1 cells were pre-treated by the caspase-1 inhibitor Z-YVAD-FMK at 10  $\mu$ M, and one hour before stimulation of LX-2 cells with CM, 1  $\mu$ g/mL of IL-6 receptor targeting monoclonal antibody Tocilizumab, or 1  $\mu$ g/mL of IL-1 receptor 1 antagonist Anakinra, were added. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.  $\alpha$   $p < 0.05$ ,  $\alpha\alpha$   $p < 0.01$ ,  $\alpha\alpha\alpha$   $p < 0.001$ , relative to control (Ø). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , relative to control (blank) without LPS+MSU. #  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$  relative to LPS+MSU condition.



**Figure 3 - Role of TNF- $\alpha$ , in association or not with inflammasome activation in cellular response of LX-2 cells with conditioned media from THP-1 cells.** mRNA expression levels of metalloproteinases (MMP)-1 (A), MMP-3 (B), MMP-9 (C), COL1A1/collagen I  $\alpha$ 1 (D), ACTA2/ $\alpha$ -smooth muscle actin (E), IL1B/interleukin-1 $\beta$  (F), IL6/interleukin-6 (G), CXCL8/interleukin-8 (H), CXCL1/GRO $\alpha$  (I), and CCL2/MCP1 (J) were measured and normalized against that of GAPDH (using real-time PCR) in LX-2 cells. LX-2 cells were stimulated 24 hours, or not, with conditioned media (CM) obtained from PMA-differentiated THP-1 cells, in which the inflammasome was activated, or not, with 18 hours of lipopolysaccharide (LPS) at 100 ng/mL followed by 6 hours of 300  $\mu$ g/mL of monosodium urate (MSU) crystals. In some conditions, one hour before MSU crystals stimulation, THP-1 cells were pre-treated by the caspase-1 inhibitor Z-YVAD-FMK at 10  $\mu$ M, and one hour before stimulation of LX-2 cells with CM, 100  $\mu$ g/mL of TNF- $\alpha$  targeting monoclonal antibody Infliximab were added, with or without association with Z-YVAD-FMK condition. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.  $\alpha$   $p < 0.05$ ,  $\alpha\alpha$   $p < 0.01$ ,  $\alpha\alpha\alpha$   $p < 0.001$ , relative to control ( $\emptyset$ ). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , relative to control (blank) without LPS+MSU. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  relative to LPS+MSU condition.

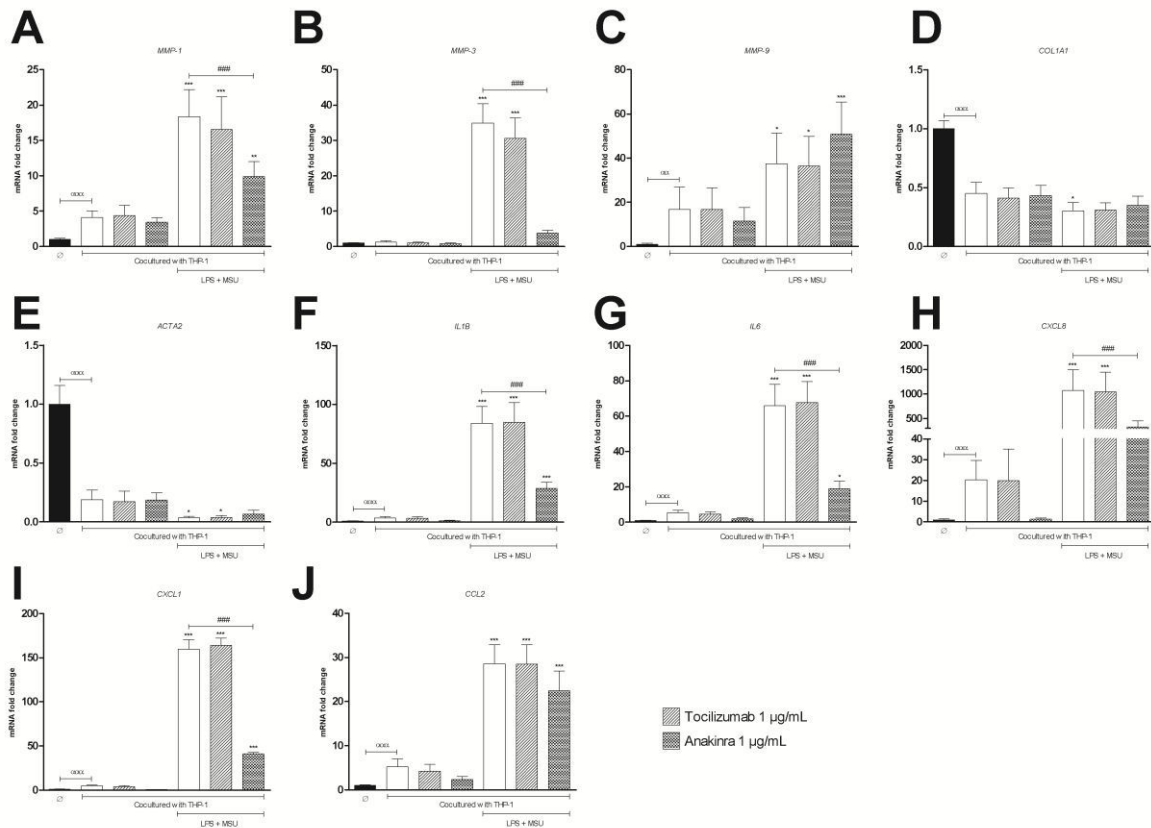
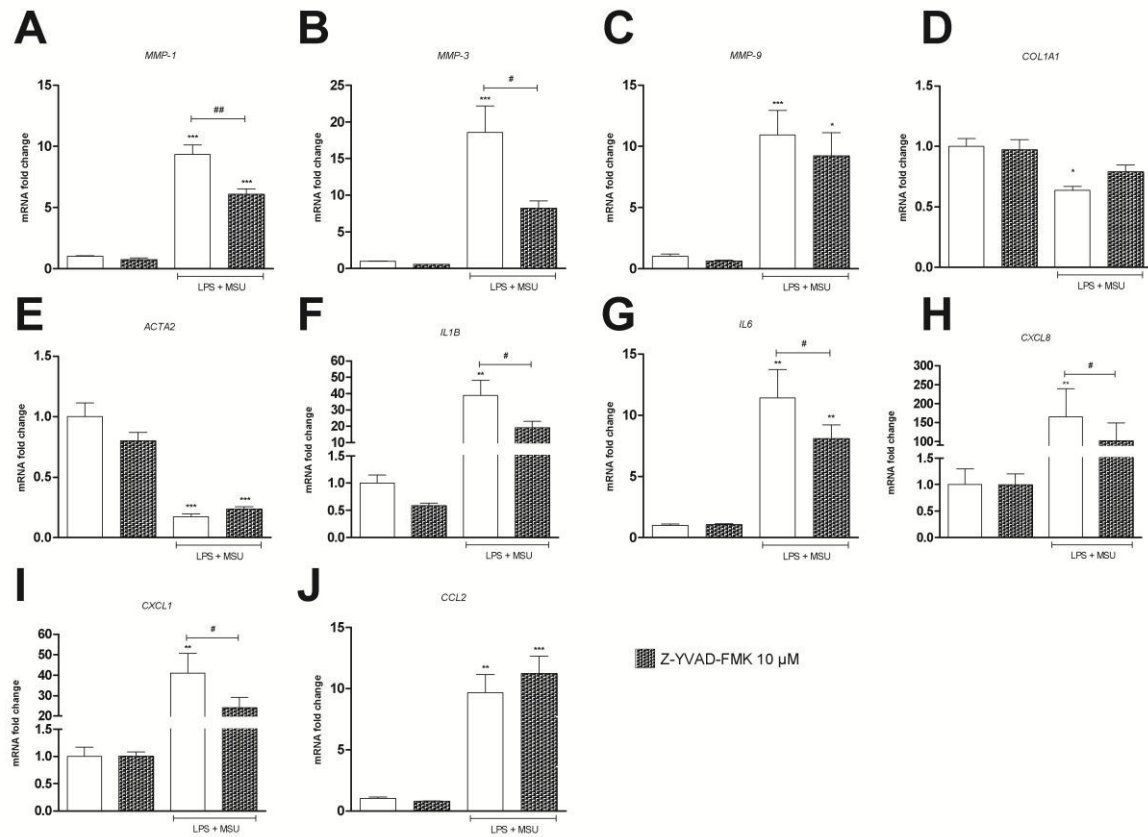


Figure 4 - **Role of IL-6 and IL-1 $\beta$  in the cellular response of LX-2 cells co-cultured with THP-1 cells.** mRNA expression levels of metalloproteinases (MMP)-1 (A), MMP-3 (B), MMP-9 (C), COL1A1/collagen I  $\alpha$ 1 (D), ACTA2/ $\alpha$ -smooth muscle actin (E), IL1B/interleukin-1 $\beta$  (F), IL6/interleukin-6 (G), CXCL8/interleukin-8 (H), CXCL1/GRO $\alpha$  (I), and CCL2/MCP1 (J) were measured and normalized against that of GAPDH (using real-time PCR) in LX-2 cells. LX-2 cells were co-cultured with PMA-differentiated THP-1 cells, in which the inflammasome was activated, or not, with 18 hours of lipopolysaccharide (LPS) at 100 ng/mL followed by 28 hours of 300  $\mu$ g/mL of monosodium urate (MSU) crystals. In some conditions, one hour before being put in co-culture, LX-2 cells were pre-treated with 1  $\mu$ g/mL of Tocilizumab or 1  $\mu$ g/mL of Anakinra. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.  $\alpha\alpha$   $p < 0.01$ ,  $\alpha\alpha\alpha$   $p < 0.001$ , relative to control ( $\emptyset$ ). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , relative to control (blank) without LPS+MSU. ####  $p < 0.001$  relative to LPS+MSU condition.



**Figure 5 - Role of inflammasome activation in THP-1 cells in the cellular response of LX-2 cells co-cultured with THP-1 cells.** mRNA expression levels of metalloproteinases (MMP)-1 (A), MMP-3 (B), MMP-9 (C), COL1A1/collagen I  $\alpha$ 1 (D), ACTA2/ $\alpha$ -smooth muscle actin (E), IL1B/interleukin-1 $\beta$  (F), IL6/interleukin-6 (G), CXCL8/interleukin-8 (H), CXCL1/GRO $\alpha$  (I), and CCL2/MCP1 (J) were measured and normalized against that of GAPDH (using real-time PCR) in LX-2 cells. LX-2 cells were co-cultured with PMA-differentiated THP-1 cells, in which the inflammasome was activated, or not, with 18 hours of lipopolysaccharide (LPS) at 100 ng/mL followed by 28 hours of 300  $\mu$ g/mL of monosodium urate (MSU) crystals. In some conditions, one hour before MSU crystals stimulation, THP-1 cells were pre-treated by the caspase-1 inhibitor Z-YVAD-FMK at 10  $\mu$ M. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , relative to control (blank) without LPS+MSU. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  relative to LPS+MSU condition.



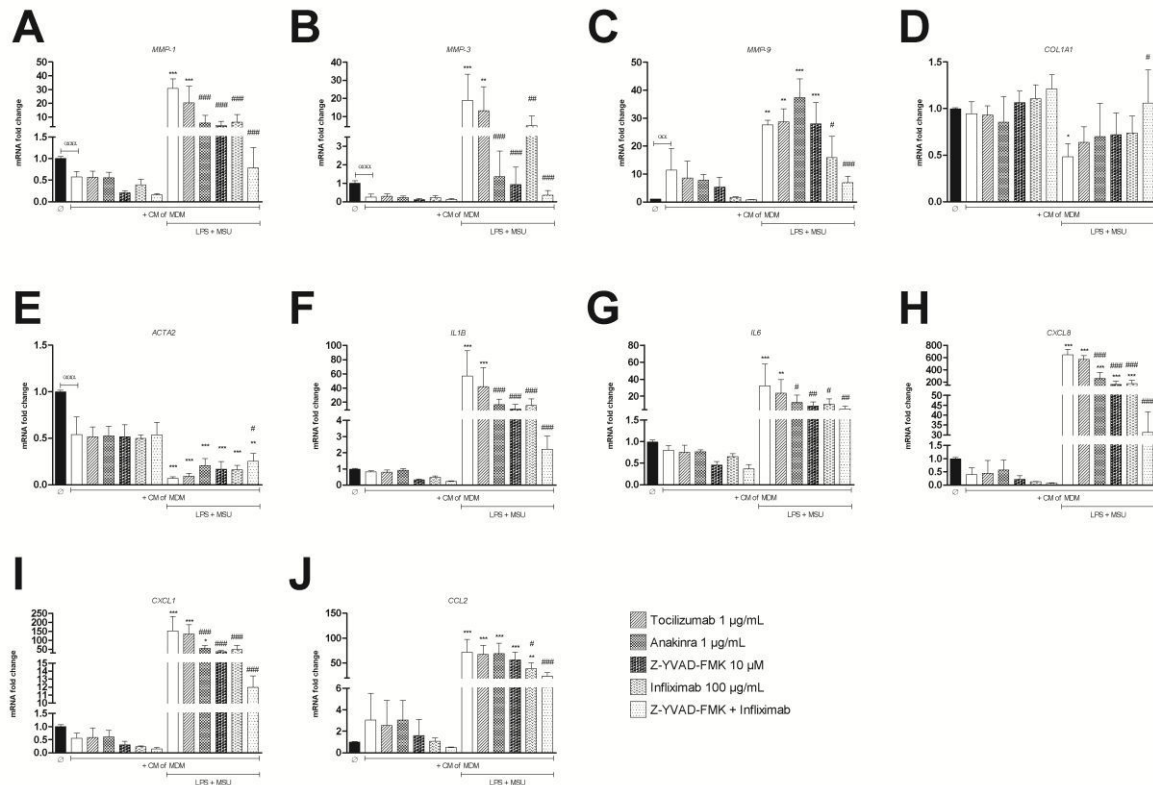
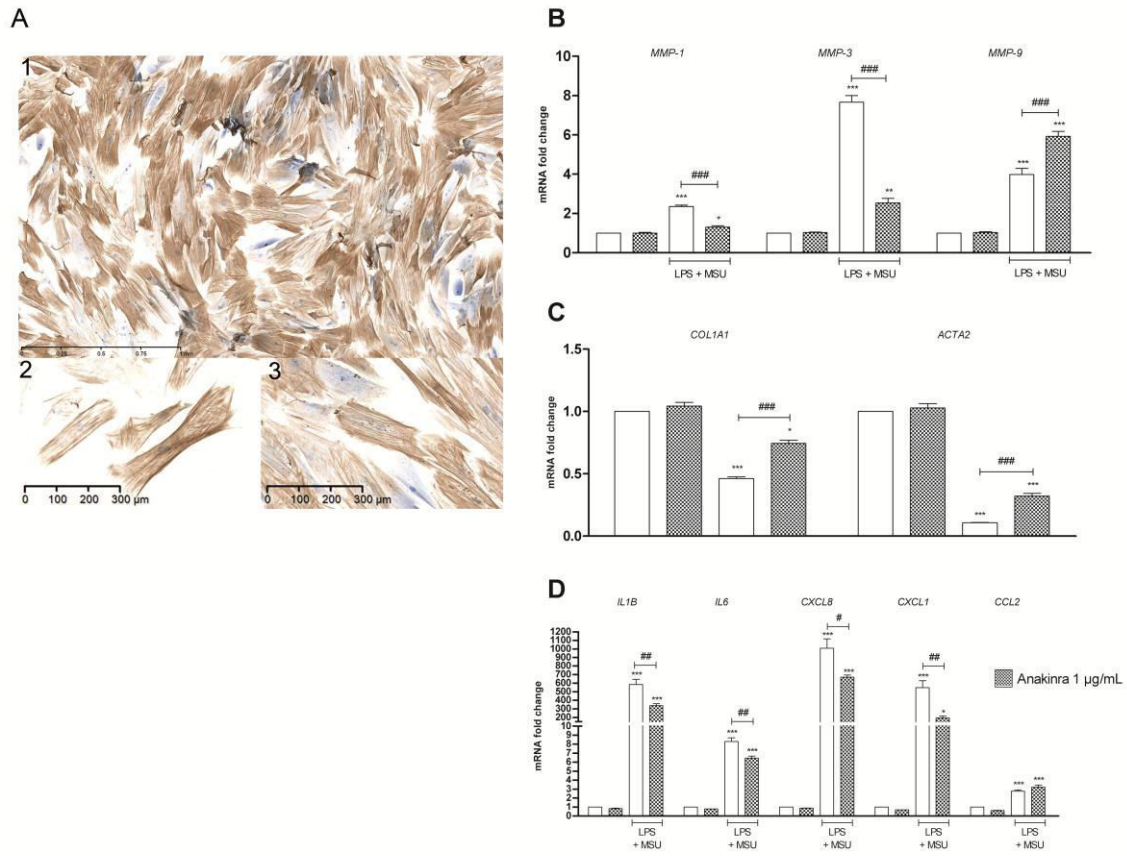


Figure 6 - Role of IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , in association or not with inflammasome activation in the cellular response of LX-2 cells with conditioned media from human monocyte-derived macrophages. mRNA expression levels of metalloproteinases (MMP)-1 (A), MMP-3 (B), MMP-9 (C), COL1A1/collagen I  $\alpha$ 1 (D), ACTA2/ $\alpha$ -smooth muscle actin (E), IL1B/interleukin-1 $\beta$  (F), IL6/interleukin-6 (G), CXCL8/interleukin-8 (H), CXCL1/GRO $\alpha$  (I), and CCL2/MCP1 (J) were measured and normalized against that of GAPDH (using real-time PCR) in LX-2 cells. LX-2 cells were stimulated 24 hours, or not, with conditioned media (CM) obtained from human monocyte-derived macrophages (MDM), in which the inflammasome was activated, or not, with 18 hours of lipopolysaccharide (LPS) at 100 ng/mL followed by 6 hours of 300  $\mu$ g/mL of monosodium urate (MSU) crystals. In some conditions, one hour before MSU crystals stimulation, MDM were pre-treated by the caspase-1 inhibitor Z-YVAD-FMK at 10  $\mu$ M, and one hour before stimulation of LX-2 cells with CM, 1  $\mu$ g/mL of Tocilizumab, or 1  $\mu$ g/mL of Anakinra, or 100  $\mu$ g/mL of Infliximab were added, with or without association with Z-YVAD-FMK condition. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.  $\alpha\alpha$   $p < 0.01$ ,  $\alpha\alpha\alpha$   $p < 0.001$ , relative to control ( $\emptyset$ ). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , relative to control (blank) without LPS+MSU. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  relative to LPS+MSU condition.



**Figure 7 - Role of IL-1 $\beta$  in the cellular response of primary human hepatic stellate cells with conditioned media from THP-1 cells under inflammasome activation.** (A)  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin (SMA) immunostaining of cultured primary human hepatic stellate cells (HSC) isolated and purified from patients were conducted on 7-days cultured cells on plastic dishes. (B) mRNA expression levels of metalloproteinases (MMP)-1, MMP-3, and MMP-9, (C) of fibrogenesis factor COL1A1/collagen I  $\alpha$ 1, and of myofibroblast differentiation factor (ACTA2/ $\alpha$ -SMA), (D) and pro-inflammatory cytokines (IL1B/interleukin-1 $\beta$ , IL6/interleukin-6), and chemokines (CXCL8/interleukin-8, CXCL1/GRO $\alpha$ , and CCL2/MCP1) were measured and normalized against that of GAPDH (using real-time PCR) in primary human HSC. HSC were stimulated 24 hours, or not, with conditioned media (CM) obtained from PMA-differentiated THP-1 cells, in which the inflammasome was activated, or not, with 18 hours of lipopolysaccharide (LPS) at 100 ng/mL followed by 6 hours of 300  $\mu$ g/mL of monosodium urate (MSU) crystals. In some conditions, one hour before stimulation of HSC with CM, 1  $\mu$ g/mL of Anakinra was added. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , relative to control (blank) without LPS+MSU. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  relative to LPS+MSU condition.

## **SUPPLEMENTARY**

### ***LX-2 cells and THP-1 cells show no cytotoxicity toward RPMI 1640 and DMEM medium, respectively***

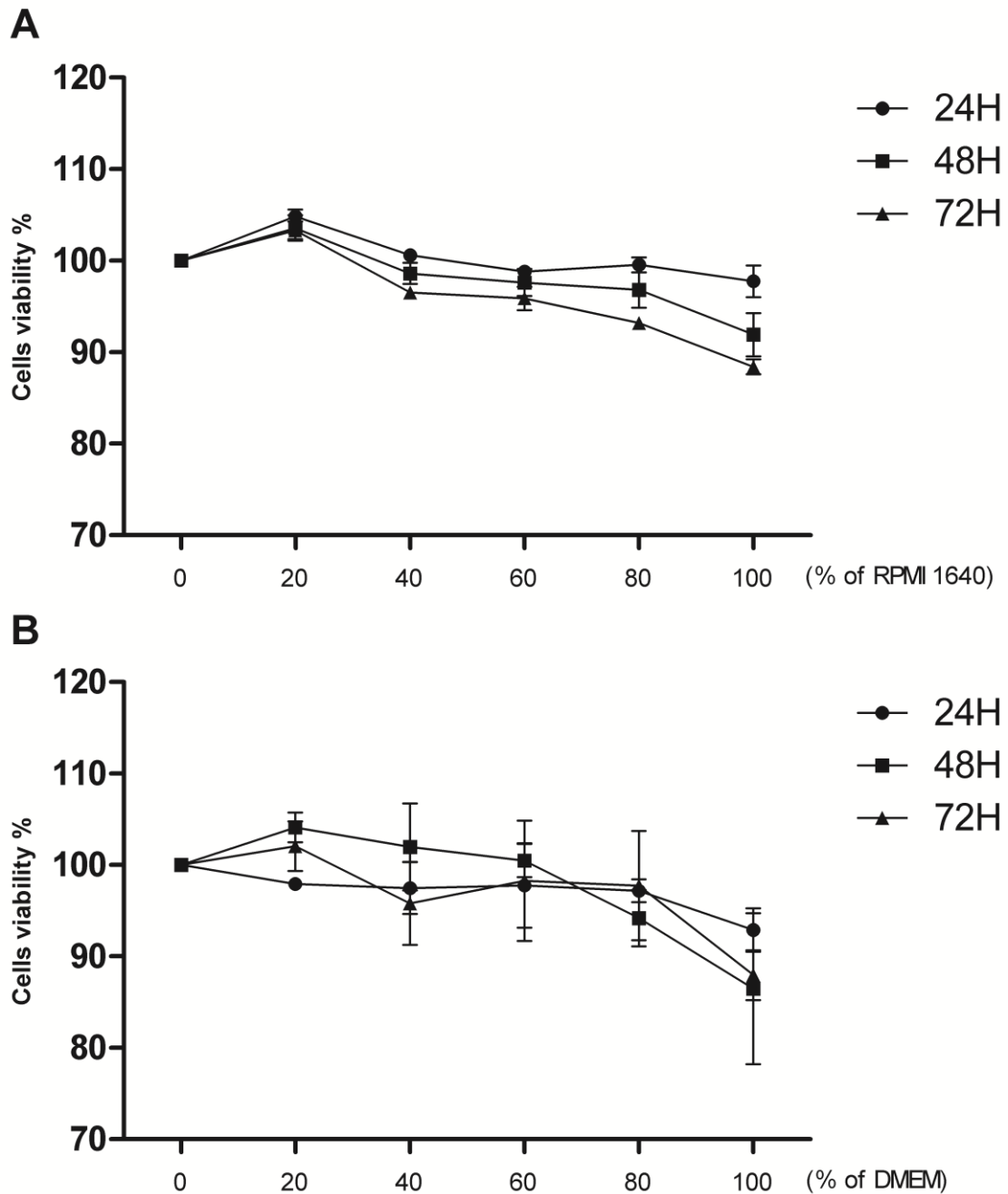
No evidence of cytotoxicity toward the RPMI 1640 medium were detected in LX-2 cells, even after three days of incubation in a full-RPMI 1640 medium where the viability of cells stay above 90% (S1 A). A very low cytotoxicity, above 10% compared to full-RPMI 1640 condition, was detected in THP-1 cells toward full-DMEM medium and more than 24 hours incubation (S1 B) suggesting carrying out the co-cultures of THP-1 and LX-2 cells into the 80% DMEM-20% RPMI 1640 mix medium.

### ***Activation of inflammasome pathway in THP-1 cells elicits a pro-inflammatory, but not a pro-fibrogenic environment***

CM obtained from THP-1 cells, with or without inflammasome activation by LPS and MSU crystals, were added on LX-2 cells for 24 hours and analyzed by ELISA assay. We observed that after the activation of inflammasome in THP-1 cells and incubation with LX-2 cells induce the overexpression and release of IL-1 $\beta$  (S2 A), IL-6 (S2 B), TNF- $\alpha$  (S2 C), CXCL8/IL-8 (S2 D) and CXCL1/GRO $\alpha$  (S2 E) but not the pro-collagen I  $\alpha$ 1 (S2 F), compared to LX-2 cells incubated with CM obtained from unstimulated-THP-1 cells. Pre-treatment of LX-2 cells with Anakinra before stimulation with CM reduce the release of IL-6 (S2 B), CXCL8/IL-8 (S2 D) and CXCL1/GRO $\alpha$  (S2 E) but not IL-1 $\beta$  (S2 A) and TNF- $\alpha$  (S2 C). Stimulation of LX-2 cells with CM obtained from pre-treated THP-1 cells with Z-YVAD-FMK reduce the release of IL-1 $\beta$  (S2 A), IL-6 (S2 B), CXCL8/IL-8 (S2 D) and CXCL1/GRO $\alpha$  (S2 E) but not TNF- $\alpha$  (S2 C). Pre-treatment of LX-2 cells with Tocilizumab before stimulation with CM doesn't reduce the levels of protein release.

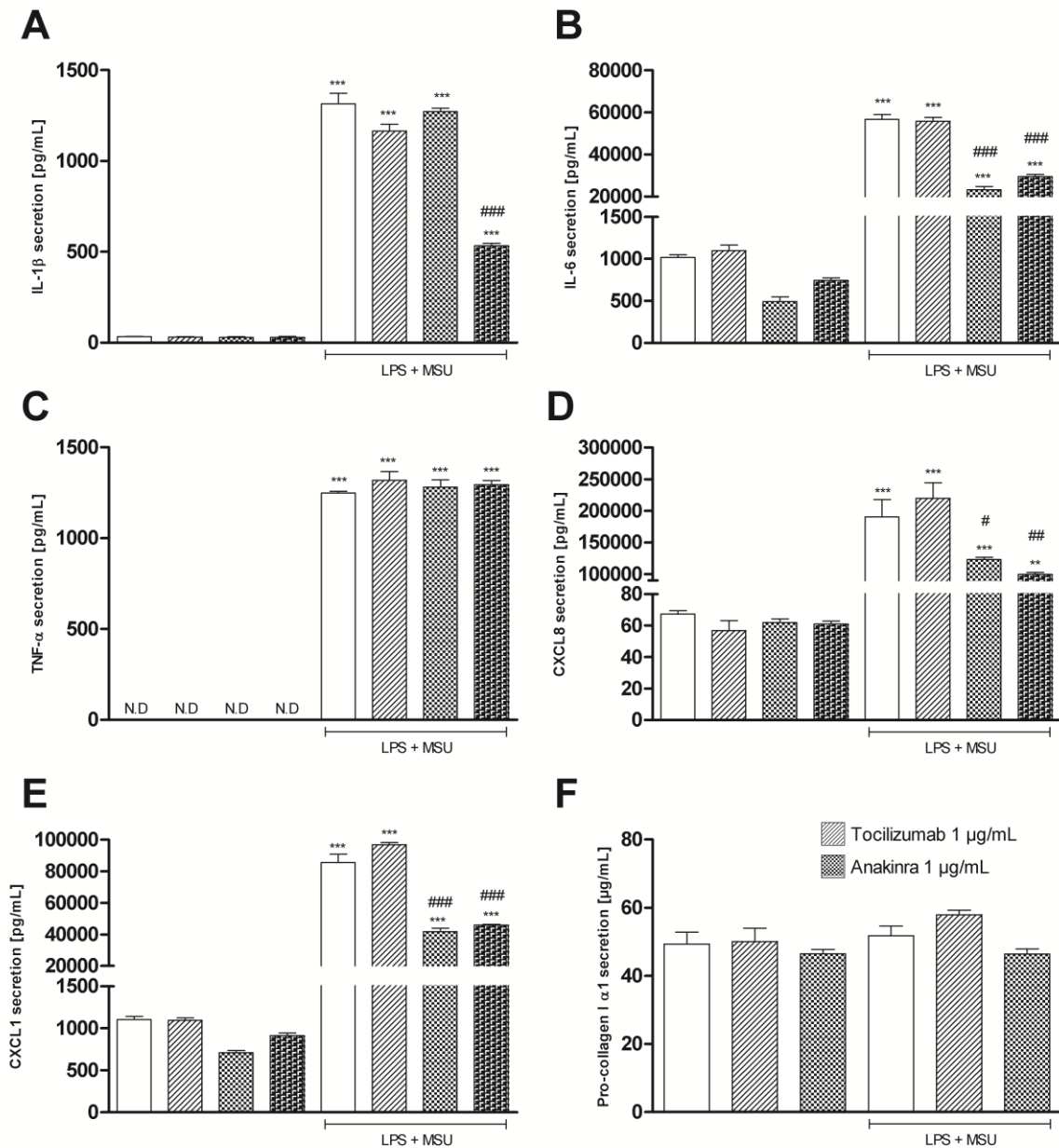
### ***Conditioned media from THP-1 cells does not induce changes of gelatinase activities in LX-2 cells***

The zymography results showed that gelatinase (MMP-2 and MMP-9) activity was not modified following stimulation of LX-2 cells with CM obtained from THP-1 cells activated with LPS and MSU crystals compared to CM obtained from unstimulated THP-1 cells (S3 A). Anakinra pre-treatment on LX-2 cells show a small, non-significant, reduced activity of MMP-9 however (S3 B).



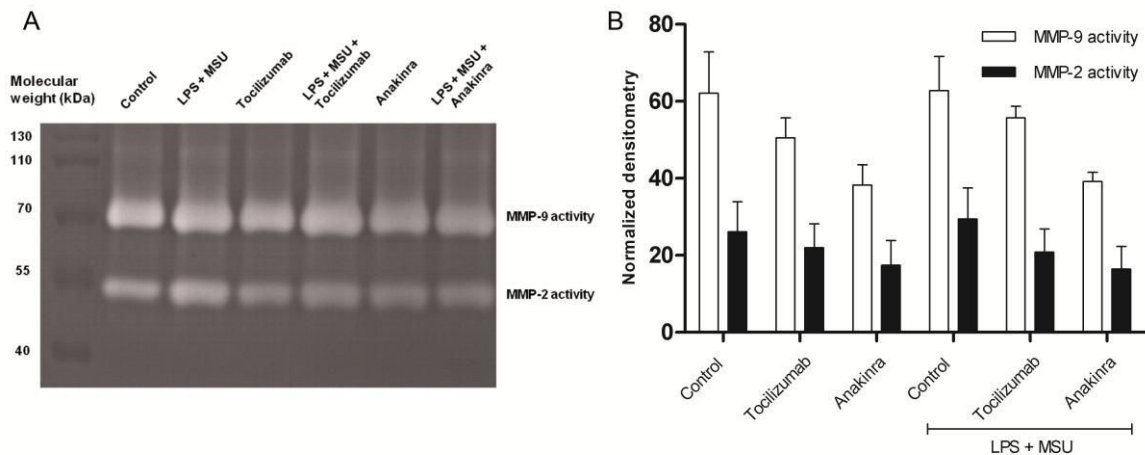
Supplementary 1 - Cytotoxicity of LX-2 cells toward RPMI 1640 medium, and THP-1 cells toward DMEM medium. (A) LX-2 cells were cultured with different ratio of DMEM and RPMI 1640 during 24, 48 or 72 hours. Cell viability were evaluated by MTT assay and normalized to the reference medium of LX-2 cells, DMEM. (B) PMA-differentiated THP-1 cells were cultured with different ratio of RPMI 1640 and DMEM during 24, 48 or 72 hours. Cell viability was evaluated by MTT assay and normalized to the reference medium of THP-1

cells, RPMI 1640. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.



Supplementary 2 - Analysis of the released proteins in LX-2 cells stimulated with conditioned media from THP-1 cells under inflammasome activation. LX-2 cells were stimulated 24 hours with conditioned media (CM) obtained from PMA-differentiated THP-1 cells, in which the inflammasome was activated, or not, with 18 hours of lipopolysaccharide (LPS) at 100 ng/mL followed by 6 hours of 300  $\mu$ g/mL of monosodium urate (MSU) crystals. In some conditions, one hour before MSU crystals stimulation, THP-1 cells were pre-treated by the caspase-1 inhibitor Z-YVAD-FMK at 10  $\mu$ M, and one hour before stimulation of LX-2

cells with CM, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Tocilizumab or 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Anakinra were added. Supernatants were harvested and IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), TNF- $\alpha$  (C), CXCL8/IL-8 (D), CXCL1/GRO $\alpha$  (E), and pro-collagen I  $\alpha 1$  (F) releases were quantified by ELISA assay. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.



Supplementary 3 - **Effects of conditioned media from inflammasome-activated THP-1 cells on the gelatinase (MMP-2 and MMP-9) activity in LX-2 cells.** (A) Gelatinase activities of MMP-9 and MMP-2 released by LX-2 cells into the supernatant after 24 hours of treatment with CM obtained from PMA-differentiated THP-1 cells under, or not, the inflammasome activation with 18 hours of LPS at 100 ng/mL followed by 6 hours with MSU crystals at 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , were evaluated by zymography and normalized densitometry. In some conditions, LX-2 cells were pre-treated 1 hour before CM stimulation with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Tocilizumab or 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Anakinra. (B) Gelatinase activities of MMP-9 and MMP-2 were evaluated by normalized densitometry. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.



### **3- Conclusion**

Ces travaux ont ainsi permis de montrer que l'activation de l'inflammasome dans des macrophages conduit à promouvoir un environnement fortement pro-inflammatoire pour les fibroblastes hépatiques, pas uniquement dépendant de la régulation de l'IL-1 $\beta$  mais également, et certainement indirectement de celle du TNF- $\alpha$ .

Cela conduit à des propriétés fibrolytiques chez ces cellules, à une plus forte activité inflammatoire avec un recrutement possible de nombreux autres partenaires cellulaires du foie, et également à une diminution de l'activation myofibroblastique.

Ces résultats semblent aller dans le sens de l'hypothèse que l'inflammasome est responsable *in vivo* d'une activation indirecte des myofibroblastes pour favoriser ainsi l'installation d'une fibrose hépatique par d'autres médiateurs, acteurs cellulaires, ou mêmes d'autres mécanismes.





# **Discussion générale**



## Discussion générale

La contribution de l'inflammasome-NLRP3 à la fibrose a été établie dans plusieurs modèles expérimentaux (Szabo and Petrasek, 2015). Il a été montré notamment que des souris génétiquement déficientes pour des éléments constitutifs de l'inflammasome ou de la voie de signalisation de l'IL-1 $\beta$  sont protégées de la fibrose pulmonaire induite par des instillations de bléomycine (Gasse et al., 2007). Mais son rôle dans le foie n'est pas encore clairement mis en évidence. L'un des premiers objectifs de nos travaux était en conséquence d'étudier le développement de la fibrose hépatique induite par du CCl<sub>4</sub>, d'une part chez des souris *knockout* pour IL-1R1, P2RX7 et NLRP3, d'autre part chez des souris prétraitées par un antagoniste non-sélectif des récepteurs purinergiques, la suramine.

Contrairement à des études conduites avec d'autres facteurs d'induction de la fibrose hépatique, ni la déficience génétique de composants de l'inflammasome-NLRP3 ou de la voie de l'IL-1 $\beta$ , ni l'administration de suramine, ne nous ont permis de démontrer le rôle joué par l'inflammasome dans ce modèle.

En effet, les taux circulants d'IL-1 $\beta$  n'étaient pas augmentés chez ses animaux après 3 semaines de traitement au CCl<sub>4</sub> et une diminution de l'expression de l'ARNm de l'IL-1 $\beta$  était mesurée, mais en parallèle, une augmentation significative de l'expression génétique de NLRP3 mais aussi de P2RX7 et de la pannexine 1 était observée.

Il a cependant été montré que l'activation constitutive de l'inflammasome-NLRP3 et l'hyperproduction d'IL-1 $\beta$  chez la souris induit une inflammation sévère au niveau du foie avec une infiltration de neutrophiles, ainsi qu'une activation des CEF conduisant au dépôt de collagène (Wree et al., 2014). Dans une autre étude, l'inactivation du récepteur P2X7, semblant pourtant sans effet dans notre modèle, permet de réduire l'hépatotoxicité induite par de forte dose de paracétamol (Hoque et al., 2012). La déficience de NLRP3 ou de la protéine adaptatrice ASC chez la souris réduit la fibrose hépatique induite par le TAA et même le CCl<sub>4</sub> (Watanabe et al., 2009), alors que dans notre modèle d'étude, la déficience similaire de NLRP3 ne permet pas de diminuer la fibrose hépatique. Les différences entre cette étude et la notre est que les souris ont été traitées pendant, non pas 3 semaines, mais 8 semaines avec des injections IP de CCl<sub>4</sub> deux fois par semaine, suggérant que l'inflammasome-NLRP3 possède une implication plus tardive dans le développement de la fibrose hépatique à un stade avancé de lésions du foie. Egalement, la déficience de l'IL-1R1, ainsi que celle de la caspase-1 et de ASC, chez la

souris permet de réduire les dommages, l'inflammation et la stéatose hépatique induite par l'éthanol (Petrasek et al., 2012). Par ailleurs, rappelons que les taux d'IL-1 $\beta$  sont élevés aussi bien dans des modèles animaux de fibrose hépatique (Gielsing et al., 2009) mais également chez des patients atteints d'hépatite virale C (Negash et al., 2013) et dans la cirrhose alcoolique (Khoruts et al., 1991; McClain et al., 1986). De plus l'IL-1 $\beta$  participe également à la fibrose induite dans la stéatohépatite (Miura et al., 2010) et elle a été montrée capable d'induire la survie des myofibroblastes hépatiques, conduisant ainsi à la perpétuation de la fibrose (Pradere et al., 2013).

Notre hypothèse était alors la suivante : dans un contexte d'inflammation chronique, l'activation de l'inflammasome par des PAMP provenant de l'espace porte suite à l'augmentation de la perméabilité du tractus gastrointestinal, et/ou par des DAMP produit au cours du stress oxydant et/ou après libération du contenu cellulaire des hépatocytes nécrotiques, joue un rôle dans l'activation des CEF en myofibroblastes. Notre objectif était en particulier de déterminer si ce mécanisme intervient directement dans les CEF, permettant à la signalisation de l'IL-1 $\beta$ , par voie autocrine, d'induire l'activation de ces cellules, ou si des voies indirectes, faisant appel à d'autres acteurs cellulaires comme les macrophages hépatiques sont mises en jeu.

Pour ce faire, nous nous sommes intéressés aux effets de plusieurs cytokines ou chimiokines pro-inflammatoire sur une lignée cellulaire de myofibroblastes hépatiques humains, les cellules LX-2. Nous avons concentré nos travaux sur les effets de cytokines des pathologies chroniques du foie dont les taux sont les plus élevés, à savoir l'IL-6, le CXCL8/IL-8, le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ . Nous avons dans un premier temps vérifié le potentiel d'activation des cellules LX-2 vis-à-vis de la réponse fibrotique car cette lignée présente déjà certaines caractéristiques de CEF activées. Nous avons établi que l'exposition des cellules LX-2 à du TGF- $\beta$ 1, le principal médiateur pro-fibrotique du foie, entraîne une réponse de type anti-inflammatoire, combinée à une réponse pro-fibrotiques. Nous avons en effet mis en évidence dans nos conditions expérimentales une diminution des MMP de la réponse fibrolytique (MMP-1 et MMP-3) et une augmentation de MMP-2 et de TIMP-1. Pour mémoire, des taux élevés de MMP-2 et de TIMP-1 avaient été mesurés dans notre étude de la fibrose hépatique induite par le CCl<sub>4</sub> chez la souris. Ce sont également deux marqueurs fibrotiques identifiés chez l'Homme dans l'hépatite C (Boeker et al., 2002). Nous avons en outre observé une augmentation de l'expression du collagène de type I, de l'endothéline-1, peptide impliqué dans la contractilité des CEF, du PDGF-BB, le principal mitogène des CEF, et du marqueur d'activation myofibroblastique, l' $\alpha$ -SMA.

Dans le foie, les cellules capables de libérer les taux les plus élevés d'IL-1 $\beta$  sont également celles qui expriment les plus hauts niveaux de composants de l'inflammasome. Ainsi les macrophages résidents du foie, les cellules de Kupffer, expriment NLRP1, NLRP3 et AIM2 (Boaru et al., 2012; Miura et al., 2010; Negash et al., 2013).

Nous nous sommes intéressés aux mécanismes de communication entre les macrophages et les fibroblastes hépatiques, dans des conditions d'activation de l'inflammasome après traitement *in vitro* par du LPS et des cristaux de MSU. Nous avons mis au point plusieurs modèles de co-culture à partir d'une part de la lignée monocyttaire THP-1 différenciée au PMA ou de MDM différenciés au GM-CSF et d'autre part de la lignée cellulaire LX-2 ou de fibroblastes hépatiques humains en culture primaire. Deux approches de coopération cellulaires ont été étudiées. La première impliquait la préparation de milieux conditionnés obtenus à partir de macrophages activés. Ces milieux étaient ensuite utilisés pour la culture des fibroblastes hépatiques. La seconde qui permet un contact plus direct entre les populations cellulaires était basée sur l'utilisation d'inserts de culture disposant d'une membrane poreuse pour permettre notamment l'échange de facteurs solubles.

Nous avons montré que ce sont les ARNm de NLRP3 qui sont le plus fortement exprimés dans la lignée monocyttaire THP-1 par rapport aux autres types d'inflammasome. Dans ces cellules la libération d'IL-1 $\beta$  nécessite la combinaison de deux signaux activateurs de l'inflammasome. Le premier de la catégorie des PAMP comme le LPS, capable de se fixer au récepteur TLR4 et d'induire l'expression de pro-IL-1 $\beta$  joue un rôle de « priming » des cellules permettant au second signal, de la catégorie des DAMP comme les cristaux de MSU, d'entraîner la libération d'IL-1 $\beta$ . Celle-ci est bien dépendante de l'activation de l'inflammasome, puisqu'un inhibiteur de la caspase-1 permet d'en diminuer le taux. Nous avons voulu comparer les résultats obtenus avec la lignée THP-1 avec des macrophages issus de la différenciation de monocytes isolés de poches de sang humain. En effet, contrairement aux cellules THP-1 qui sont différenciées avec du PMA et présentent alors un phénotype déjà pro-inflammatoire et notamment une activation constitutive de l'inflammasome, les MDM sont différenciés avec du GM-CSF. Ces cellules présentent l'intérêt de pouvoir être activées soit par des mécanismes classiques (LPS et/ou IFN $\gamma$ ) pour adopter un profil pro-inflammatoire de type M1 soit par des mécanismes « alternatifs » comme par l'IL-4 et/ou IL-10 pour adopter un profil anti-inflammatoire de type M2. De nombreuses études se sont intéressées à ces deux profils d'activation des macrophages notamment pour connaître leurs rôles respectifs dans les mécanismes physiopathologiques. Dans la fibrose hépatique, cette question reste posée. Elle est d'autant plus compliquée qu'un foie fibrotique ou cirrhotique

présente des populations très hétérogènes de macrophages, à la fois M1 et M2 (Pradere et al., 2013; Ramachandran et al., 2012). *In vitro*, il a été montré que la lignée THP-1 différenciée au PMA exprime les marqueurs monocytaires CD11b, IL-1 $\beta$ , et TLR4 (Tiwari et al., 2011), qui leur confère une capacité à répondre au LPS selon un phénotype de type M1. Il faut noter aussi que les monocytes circulants, contrairement aux macrophages, présentent une activation constitutive de la caspase-1, expliquant ainsi pourquoi le traitement par le LPS seul permet d'induire une libération d'IL-1 $\beta$  (Netea et al., 2009) dans ces cellules. Après différenciation au PMA, cette activation constitutive est maintenue mais les cellules répondent plus fortement lorsque les deux stimuli sont conjugués. Des résultats similaires ont été obtenus dans les cellules MDM après différenciation au GM-CSF (Gicquel et al., 2015).

Dans nos études, la question de la pertinence de l'utilisation de macrophages provenant de la différenciation de monocytes du sang périphérique pour reproduire les effets des macrophages résidents du foie se pose. Il a été montré que, dans le foie fibrotique, l'inflammation et la fibrogénèse provoquent une diminution du nombre de cellules de Kupffer et une forte augmentation de la proportion de macrophages hépatiques dérivant de monocytes (Holt et al., 2008b; Ramachandran et al., 2012). Le recrutement de ces cellules est conduit par la chimiokine CCL2/MCP-1. Il a d'ailleurs été montré que les CEF sont la principale source de cette chimiokine, qui est activée par les ligands du TLR4 (Seki et al., 2007). En effet, l'inhibition du CCL2/MCP-1 chez le rat, ou la déplétion génétique du récepteur CCR2 entraînent une diminution de l'infiltration de macrophages en réponse à des agressions et inhibe également la fibrose dans le foie (Imamura et al., 2005; Mitchell et al., 2009). De façon intéressante, nos résultats montrent que le taux de CCL2/MCP-1 est augmenté lors de la co-culture des fibroblastes avec les macrophages, avec ou sans activation de l'inflammasome, mais que son expression n'est pas diminuée par l'inhibition de l'IL-1 $\beta$ , suggérant qu'un autre médiateur soluble est responsable de sa régulation. Il est possible qu'il s'agisse du TNF- $\alpha$ , cependant son inhibition seule n'est pas suffisante pour réduire l'expression du CCL2/MCP-1 et nécessite également l'inhibition de la caspase-1 avec le Z-YVAD-FMK.

Dans tous les cas, les macrophages sont fortement impliqués dans le développement de la fibrose hépatique. En effet, il a été montré que leur destruction réduit le développement de la fibrose hépatique chez la souris (Duffield et al., 2005). Le GdCl<sub>3</sub> qui permet la déplétion des cellules de Kupffer entraîne une diminution de l'activation myofibroblastique et de la fibrose chez le rat traité au TAA (Ide et al., 2005), mais aussi après traitement de souris au CCl<sub>4</sub> (Rivera et al., 2001). Il réduit également les dommages induits précocement par l'éthanol (Adachi et al., 1994). L'injection de liposomes chargés en clodronate qui entraînent une

déplétion des cellules de Kupffer permet de réduire la stéatohépatite chez des souris nourries avec un régime de type MCD (Rivera et al., 2007). Des effets similaires sont obtenus dans des modèles transgéniques de lésions hépatiques et en réponse au CCl<sub>4</sub> ou à la ligation du canal biliaire (Pradere et al., 2013; Sunami et al., 2012). Par contre, le fait d'éliminer les macrophages lors de la phase de guérison du tissu hépatique après des traitements au CCl<sub>4</sub> induit un prolongement de la fibrose avec un retard dans l'élimination des fibres de collagène par le mécanisme de fibrolyse (Duffield et al., 2005). Ces deux rôles distincts, pro- ou anti-fibrotiques permettent de suggérer soit l'intervention, lors des différentes étapes de la fibrogénèse, de populations de macrophages fonctionnellement différents, soit des modifications de la fonction des macrophages sous l'influence des variations du microenvironnement cellulaire.

Pour tenter de mieux comprendre le rôle des macrophages, il faut rappeler qu'ils sont la principale source de TGF- $\beta$  au niveau du foie. Chez la souris, il a été montré que la suppression d'une population de monocytes/macrophages CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> (Ly6C<sup>hi</sup>) lors du développement de la fibrose hépatique induite par le CCl<sub>4</sub>, permet de diminuer l'activation des myofibroblastes et le dépôt de collagène, identifiant ainsi ces cellules comme une sous-population de macrophages pro-fibrotiques (Karlmark et al., 2009). Au contraire, les MDM CCR2<sup>high</sup>Ly6C<sup>low</sup> présentent des caractéristiques proches des macrophages polarisés M2 dans différentes situations pathologiques associées à une fibrose (Beschinn et al., 2013). Il semblerait que les macrophages recrutés dans le foie exhibent plus souvent un phénotype pro-inflammatoire M1 lors des phases précoces de la réponse cicatricielle (Murray and Wynn, 2011). Alors que le développement à des stades plus avancés de la fibrose devrait suggérer une prédominance des macrophages anti-inflammatoires M2, puisqu'ils expriment fortement le TGF- $\beta$ , ce constat est incompatible avec l'inflammation persistante retrouvée à toutes les phases de la fibrose hépatique (Duffield et al., 2005). De plus, les populations de macrophages isolés de patients cirrhotiques expriment de forts niveaux de médiateurs pro-inflammatoires (Zimmermann et al., 2010). Il semble donc que les profils d'activation des macrophages hépatiques au cours de la fibrose ne répondent pas strictement à la classification M1/M2. De plus, l'environnement cellulaire des macrophages produit des médiateurs entraînant le développement des deux sous-populations M1 et M2 (De Minicis et al., 2007; Holt et al., 2008a; Kordes et al., 2009). D'ailleurs, il est à noter qu'une étude a montré chez des rats traités au TAA, et ayant développé une cirrhose, qu'il y avait une prédominance des facteurs de macrophages M1 et M2, sans aucune distinction temporelle (Wijesundera et al., 2014). L'explication la plus probable est qu'une forte dynamique du microenvironnement est



imposée par les lésions répétées, conduisant à la fois à une inflammation persistante et à la fibrose (Iredale, 2007; Seki and Schnabl, 2012).

Nous avons développé des modèles de co-culture sur la base d'une grande proximité entre ces types cellulaires dans le foie. En effet, compte tenu de leur position anatomique dans l'espace de Disse entre l'endothélium fenestré et les hépatocytes, les CEF sont bien placées pour interagir avec de nombreuses cellules du foie, et notamment, dans un foie fibrotique, avec les macrophages qui sont situés au contact des myofibroblastes activés dans les zones de tissu cicatriciel (Duffield et al., 2005; Fallowfield et al., 2007; Liu et al., 2010). Tandis que la seule culture de CEF activés *in vitro* ne reproduit que partiellement les changements caractéristiques des CEF lors de la cirrhose hépatique, la co-culture des CEF avec les cellules de Kupffer se rapproche plus de la situation *in vivo* (De Minicis et al., 2007), permettant également d'étudier les interactions entre ces deux populations cellulaires du foie.

La communication entre les macrophages et les fibroblastes du foie conduit à des modifications de la fonction et des types de cytokines libérées par les deux populations cellulaires (Bonocchi et al., 2000; Song et al., 2000). Il a été montré que les MDM produisent du TGF- $\beta$  qui active par la suite les CEF (Karlmark et al., 2009). Des études *in vitro* et *in vivo* montrent également que les cellules de Kupffer peuvent induire la transdifférenciation des CEF en myofibroblastes, par le biais de mécanismes paracrines, impliquant principalement la cytokine pro-fibrotique TGF- $\beta$  et le facteur mitogène PDGF (De Minicis et al., 2007; Stewart et al., 2014). Lorsque différentes populations de monocytes sont isolées du foie de patients atteints d'une fibrose hépatique, la sous-population CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> libère de nombreuses cytokines inflammatoires qui activent les CEF *in vitro* en culture primaire (Liaskou et al., 2013; Zimmermann et al., 2010). Dans une étude de co-culture réalisée entre des MDM humains et la lignée de fibroblastes pulmonaires WI-38, il a été montré que les macrophages de type M1 inhibent la fibrogénèse des fibroblastes par la libération de facteurs anti-fibrogéniques ou bien fibrolytiques, tandis que les macrophages de type M2 stimulent la fibrogénèse des fibroblastes grâce à la libération de facteurs pro-fibrogéniques (Song et al., 2000). Parce que les macrophages de type M2 sont communément observés lors du pic de la réponse immunitaire pro-fibrotique, l'hypothèse émise est qu'ils sont des inducteurs importants de la cicatrisation et de la fibrose. Cependant, des études mécanistiques menées chez des souris  $LysM^{Cre}IL-4R\alpha^{-/flox}$ , chez lesquelles une recombinaison induit la délétion de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-4 dans les lignées de cellules myéloïdes, ont permis de démontrer que les macrophages M2 ne sont pas requis pour le développement de la fibrose hépatique induite après infection à *Schistosoma mansoni* (Herbert et al., 2004). Dans une autre étude de

co-culture entre des macrophages polarisés M1 ou M2 avec des fibroblastes du derme, les facteurs sécrétés par les macrophages M1 modifient le phénotype des fibroblastes pour induire un état pro-inflammatoire caractérisé par une augmentation de l'expression des MMP-1, MMP-2, MMP-3 et MMP-14, tandis que les facteurs sécrétés par les macrophages M2 n'induisent pas d'activation myofibroblastique mais pourraient au contraire avoir un effet inhibiteur sur les fibroblastes activés (Ploeger et al., 2013).

De façon intéressante, cette communication ne semble pas aller uniquement dans le sens des monocytes/macrophages vers les fibroblastes. En effet, les CEF peuvent également avoir un impact sur le phénotype des macrophages. Tout d'abord, il a été montré que les CEF expriment des composants de l'inflammasome (Masumoto et al., 2001; Rawat et al., 2010; Watanabe et al., 2009). Le traitement des CEF avec du LPS augmente drastiquement l'expression des NLR, suggérant ainsi que l'activation de l'inflammasome est l'une des facettes de plus permettant aux CEF de contribuer à l'immunité du foie (Boaru et al., 2012). Dans une étude précédente réalisée avec les cellules LX-2, il a été montré que l'utilisation de cristaux de MSU sur ces cellules induit l'augmentation de l'expression des ARNm du TGF- $\beta$  et du collagène de type I, ainsi qu'une réorganisation de l'actine, ce qui n'a pas été observé lorsque des composants de l'inflammasome étaient absents (Watanabe et al., 2009). Au cours de nos travaux, nous avons observé une forte expression d'ARNm de NLRP1 par rapport aux autres NLR et AIM2 dans les cellules LX-2, mais également que la co-stimulation de ces cellules avec le LPS et les cristaux de MSU induit la libération faible mais significative d'IL-1 $\beta$ . Nous avons pu observer également l'augmentation de l'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans les fibroblastes, sous l'influence des cellules THP-1 seules mais aussi dans les expériences d'activation de l'inflammasome dans les macrophages. Il a été montré que les CEF peuvent aussi provoquer une réponse pro-inflammatoire sur les cellules de Kupffer puisque la déplétion des cellules étoilées dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez la souris suivie d'un traitement au LPS induit la diminution de l'expression du TNF- $\alpha$  et du CXCL1/GRO $\alpha$ , et l'augmentation ou l'inaltération de l'expression de l'IL-6 (Stewart et al., 2014). En accord avec ces travaux, nos résultats indiquent donc que les cellules LX-2, comme les fibroblastes hépatiques en culture primaire, pourraient eux-mêmes stimuler de façon paracrine la signalisation inflammatoire des macrophages, dans une boucle de régulation positive.

L'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  augmentent l'expression d'IL-6, qui présente une activité de facteur de croissance autocrine pour les fibroblastes. Cependant, dans nos études, bien que l'IL-6 soit augmentée à la fois dans le milieu de co-culture et son expression dans les cellules LX-2, nous

n'avons pas mis en évidence d'effets de cette cytokine sur l'expression de gènes liés à l'inflammation, la fibrogénèse et la fibrolyse. D'une manière générale, ni un traitement avec de l'IL-6 recombinant, ni l'inhibition de l'IL-6 par le tocilizumab n'a eu d'effet sur ces cellules en co-culture. Pourtant, nous avons pu observer l'expression du récepteur à l'IL-6 par la technique de western blot dans les cellules LX-2, et ceci de manière comparable à celle observée dans les cellules hépatocytaires de la lignée HepaRG. Il est fort probable que le partenaire du complexe IL-6/IL-6R, la glycoprotéine 130 soit absente dans les cellules LX-2 puisqu'elle est essentielle à la transmission du signal, et que nous n'avons pas observé de phosphorylation du facteur de transcription lié à cette voie, STAT3, contrairement aux cellules HepaRG traitées avec de l'IL-6 recombinant. Rappelons que la cytokine IL-6 a été identifiée comme un médiateur important de la fibrose hépatique (Natsume et al., 1999), où son expression est augmentée dans les CEF activés (Holt et al., 2008a).

Des taux élevés de CXCL8/IL-8 sont observés dans les pathologies chroniques du foie. Cette chimiokine participe ainsi à l'inflammation hépatique (Zimmermann and Tacke, 2011; Zimmermann et al., 2011). De façon intéressante, elle ne semble pas directement contribuer au chimiotactisme des neutrophiles lors de la fibrogénèse, mais plutôt à l'accumulation des monocytes dans le foie fibrotique (Zimmermann et al., 2011). De plus, l'IL-8 est identifiée comme l'un des inducteurs majoritaires d' $\alpha$ -SMA dans les cellules LX-2 et les CEF en culture primaire (Clément et al., 2010). Dans ce contexte, nous avons montré que les milieux conditionnés obtenus à partir de cellules THP-1 mais aussi de MDM sans aucune stimulation sont sans effet sur les cellules LX-2. En revanche, lors de temps d'exposition plus longs (42 heures versus 24 heures avec les milieux conditionnés) ou lors des co-cultures en insert, les cellules THP-1, même non stimulées, induisent l'expression d'ARNm codant pour les cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 et les chimiokines CXCL8/IL-8, CXCL1/GRO $\alpha$  et CCL2/MCP-1. Après activation de l'inflammasome dans les macrophages, indépendamment de la méthode de co-culture employée, la communication entre les deux types cellulaires entraîne un changement phénotypique des cellules LX-2 et des CEF dans un sens pro-inflammatoire. Cet effet semble être lié à l'action de l'IL-1 $\beta$  mais également du TNF- $\alpha$ .

L'administration directe d'ARNm codant pour la MMP-1, *via* l'utilisation d'un vecteur adénoviral, permet d'atténuer la fibrose hépatique induite par l'administration de TAA à des rats, et l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le TIMP-1 diminue l'activation des CEF et la fibrose hépatique induite par le CCl<sub>4</sub> chez le rat (Iimuro et al., 2003; Parsons et al., 2004). Par ailleurs, la surexpression de MMP-9 réduit le nombre de myofibroblastes et inhibe la fibrogénèse induite par des lésions hépatiques expérimentales (Roderfeld et al., 2006). Une

autre étude montre, chez des souris mutantes présentant une perte de la fonction MMP-9, une inhibition de la fibrogénèse et une diminution de l'accumulation de collagène dans les espaces porte et périportaux. Cette mutation est à l'origine de la suppression de la transdifférenciation des CEF en leur phénotype myofibroblastique, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Roderfeld et al., 2006). Par ailleurs, les macrophages hépatiques expriment eux-mêmes plusieurs MMP, dont la MMP-9, la MMP-12 et la MMP-13 impliquées dans la dégradation de la matrice, favorisant ainsi la résolution des dommages hépatiques et de la fibrose (Fallowfield et al., 2007; Pellicoro et al., 2012). Mais la MMP-9 joue un rôle plus complexe puisqu'il a été montré que qu'elle est nécessaire à l'activation du TGF- $\beta$  (Lee et al., 2001). Dans nos études, nous avons identifié une augmentation de l'expression de la MMP-1, MMP-3 et de la MMP-9 dans les cellules LX-2 et les CEF en cultures primaires après activation de l'inflammasome dans les macrophages. Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs ou d'antagonistes spécifiques dans ces conditions, nous avons démontré que l'augmentation de l'expression de la MMP-3 est dépendante de l'activation de l'inflammasome et de la libération d'IL-1 $\beta$  qui en découle. L'expression de la MMP-9, quand à elle, est induite par la sécrétion de TNF- $\alpha$ . La régulation de l'expression de la MMP-1 semble être plus complexe car elle est dépendante à la fois de la signalisation de l'inflammasome et également du TNF- $\alpha$ . Ainsi, l'activation de l'inflammasome lors de la fibrose hépatique pourrait avoir un impact direct sur la fibrolyse et paradoxalement réduire les niveaux de fibrose. Cependant, si cette sécrétion de MMP, notamment la MMP-9, est conjointe avec une libération de TGF- $\beta$ , elle pourrait stimuler la fibrogénèse et favoriser la migration des fibroblastes hépatiques vers les zones lésées du foie de manière précoce en contribuant à la dégradation des fibres de collagènes de la lame basale.

Dans nos études de co-culture, nous avons montré que l'activation de l'inflammasome dans les macrophages confère un phénotype anti-fibrotique aux CEF, avec notamment une diminution de l'expression de l' $\alpha$ -SMA et du collagène de type I  $\alpha$ 1. Cependant nous n'avons pas pu déterminer avec certitude si ces effets sont dépendants de la libération d'IL-1 $\beta$  ou du TNF- $\alpha$ , puisque ni les prétraitements par l'anakinra, ni le Z-YVAD-FMK, ou l'infliximab n'ont permis de réduire ces effets dans les cellules LX-2. Toutefois, dans les CEF en culture primaire, l'utilisation de l'anakinra a permis de réduire partiellement les effets de l'IL-1 $\beta$  sur ces deux gènes cibles. Dans tous les cas, même si les facteurs responsables de ces effets n'ont pas pu être bien déterminés, ce résultat est en accord avec l'augmentation de l'expression des MMP également observée.

Ces résultats sont surprenants par rapport aux données collectées dans la littérature. En effet, dans plusieurs modèles *in vivo* impliquant l'activation de l'inflammasome ou un

microenvironnement inflammatoire de type M1 persistant, on note une induction de la fibrose. Les interactions entre les macrophages pro-inflammatoires et les CEF semblent être plus complexes, impliquant des signaux paracrines entre ces cellules, notamment lors des phases précoces des lésions, mais également des mécanismes indirects liés au microenvironnement cellulaire. En effet, il est fort probable que dans le foie, d'autres acteurs cellulaires, absents de notre modèle de co-culture, soient influencés par les signaux inflammatoires des macrophages, conduisant alors un signal pro-fibrotique vers les fibroblastes, ou encore que l'inflammation hépatique puisse contribuer au maintien de la fibrose par d'autres mécanismes qu'une activation myofibroblastique directe. Une étude récente va d'ailleurs dans ce sens en montrant le rôle pro-fibrotique indirect de l'activation de l'inflammasome et de la libération d'IL-1 $\beta$ . Dans ce cas, les auteurs ont montré que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  produits par les macrophages permettent d'activer la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dans les CEF, à la fois *in vitro* et *in vivo*. L'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  n'induisent pas directement l'activation des CEF mais soutiennent la survie des CEF activés *in vitro* et *in vivo*, faisant perdurer ainsi la fibrose hépatique. Un autre mécanisme indirect possible impliquerait l'apoptose des cellules du foie et notamment les hépatocytes lors des processus inflammatoires et de stress oxydants. En effet, ce phénomène génère dans le tissu des corps apoptotiques qui peuvent être phagocytés pas uniquement par les macrophages, mais également par les CEF eux-mêmes induisant ainsi leur activation (Canbay et al., 2003).

# **Conclusion et perspectives**



## Conclusion et perspectives

La compréhension des mécanismes qui régulent le développement de la fibrose hépatique constitue un enjeu important puisqu'elle doit permettre le développement de molécules anti-fibrosantes capables de contrer la progression de la maladie voire de la faire régresser. Deux événements semblent être cruciaux pour expliquer les mécanismes à l'origine des désordres et lésions tissulaires et cellulaires caractéristiques de la fibrose hépatique : l'activation de processus de l'immunité innée et l'état inflammatoire qui en découle qui sont pour une grande part portés par les macrophages résidents du foie et l'accumulation de composants de la MEC conduite par les cellules étoilées. Les relations entre ces deux phénomènes ne sont pas totalement élucidées à ce jour. L'activation de l'inflammasome, un complexe protéique impliqué dans la survenue d'une inflammation a été identifiée comme un événement précoce lors du développement de la fibrose dans plusieurs modèles expérimentaux. Nos travaux étaient centrés sur son évaluation dans un contexte de fibrose hépatique.

Les premières études que nous avons menées *in vivo* chez la souris n'ont pas permis de mettre en évidence le rôle exact de l'inflammasome dans le développement de la fibrose hépatique induite par des injections répétées de CCl<sub>4</sub>. Les travaux suivants ont été focalisés sur l'évaluation des effets de l'activation de l'inflammasome *in vitro* à partir de lignées ou de cellules en culture primaire d'origine humaine. Nous avons principalement mis en évidence que les cellules de la lignée de fibroblastes humains activés LX-2, sont capables d'adopter un phénotype fibrotique en réponse à un signal pro-fibrotique comme le TGF- $\beta$ 1, mais également de réduire la fibrolyse par la diminution de l'expression des MMP. De façon intéressante, nous avons pu constater que la signalisation pro-fibrotique du TGF- $\beta$ 1 diminue la signalisation inflammatoire dans ces cellules. En parallèle nous avons démontré que les cellules LX-2 adoptent un profil fibrolytique en réponse à des médiateurs inflammatoires. Ces cellules présentent donc la capacité de réagir très fortement et de manière différenciée aux stimuli inflammatoires et fibrotiques. Nous avons également mis en évidence leur capacité à contribuer à l'état inflammatoire.

En étudiant les mécanismes de communication entre des macrophages et les cellules LX-2, dans les modèles de co-culture que nous avons développés, nous avons pu constater que l'activation de l'inflammasome dans les macrophages est à l'origine d'un signal qui induit une réponse anti-fibrotique dans les cellules LX-2. Ce type de résultat est également mis en



évidence dans des co-cultures de cellules en culture primaire. Nous n'avons pas pu établir le lien direct entre l'IL-1 $\beta$  libérée et la diminution de l'expression du collagène de type I et de l' $\alpha$ -SMA dans les lignées cellulaires étudiées mais ce lien a pu être montré lorsque les co-cultures étaient réalisées avec des cellules en culture primaire. Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour identifier les raisons pouvant expliquer ces différences.

Parmi les événements majeurs survenant au cours de la fibrose hépatique, il faut citer la capacité des CEF à migrer vers les sites de lésions. Un fibroblaste quiescent va, en conditions pathologiques, progresser vers le tissu lésé en dégradant notamment les fibres de collagène de type IV. Sur son site d'intervention où le microenvironnement est riche en PDGF et TGF- $\beta$ , il va alors proliférer et s'activer en un myofibroblaste capable de sécréter du collagène fibreux. La migration des CEF qui conduit à une fibrose passe donc paradoxalement par une étape de fibrolyse. La dégradation du collagène de type IV est sous la dépendance de l'action de gélatinases comme la MMP-9. Des taux élevés de cette MMP ont été mesurés dans nos modèles de co-culture. Il aurait été intéressant d'évaluer dans nos conditions expérimentales le potentiel migratoire des cellules LX-2. Le test de griffure, qui permet aussi de mesurer la prolifération des cellules, en présence ou non de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , ou la culture de fibroblastes sur un insert spécialement conçu et tapissé de collagène de type IV en présence de milieu conditionné par des macrophages activés sont des expériences qui pourront être menées ultérieurement. Il faut noter que les modèles de co-culture que nous avons développés font intervenir des temps de traitements relativement courts au regard de la durée et de la chronicité caractéristiques du développement d'une fibrose *in vivo*. Il serait intéressant de poursuivre nos études sur des temps d'exposition plus longs. Il faut noter cependant qu'une dégénérescence des macrophages THP-1 est observée dès 7 jours après différenciation au PMA. Il aurait également été intéressant de déterminer l'influence des fibroblastes sur le phénotype d'activation des macrophages lors des co-cultures en insert. En effet, dans nos conditions expérimentales, les fibroblastes sécrètent des médiateurs solubles en réponse aux signaux paracrines des macrophages. Il aurait également été intéressant de poursuivre la caractérisation du profil des macrophages étudiés après activation par des méthodes de transcriptomique et de dosages ELISA de facteurs solubles. Cela permettrait de mieux connaître l'état de polarisation de ces cellules et de les comparer avec les macrophages résidents du foie, les cellules de Kupffer en culture primaire. L'impact de la polarisation des macrophages M1 ou M2 sur le profil d'activation des cellules LX-2 pourraient également être étudiés dans nos modèles de co-culture.

Enfin, les macrophages ne sont pas les seules cellules au contact des CEF dans le foie et la connaissance fine des interactions avec d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales par exemple pourraient être d'un grand intérêt pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'activation des CEF.



# Références



## Références bibliographiques

Abdel-Aziz, G., Lebeau, G., Rescan, P.Y., Clément, B., Rissel, M., Deugnier, Y., Campion, J.P., and Guillouzo, A. (1990). Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. *Am. J. Pathol.* *137*, 1333–1342.

Abdul-Sater, A.A., Tattoli, I., Jin, L., Grajkowski, A., Levi, A., Koller, B.H., Allen, I.C., Beaucage, S.L., Fitzgerald, K.A., Ting, J.P.-Y., et al. (2013). Cyclic-di-GMP and cyclic-di-AMP activate the NLRP3 inflammasome. *EMBO Rep.* *14*, 900–906.

Abergel, A., Sapin, V., Dif, N., Chassard, C., Darcha, C., Marcand-Sauvant, J., Gaillard-Martinie, B., Rock, E., Dechelotte, P., and Sauvant, P. (2006). Growth arrest and decrease of alpha-SMA and type I collagen expression by palmitic acid in the rat hepatic stellate cell line PAV-1. *Dig. Dis. Sci.* *51*, 986–995.

Abu-Absi, S.F., Hansen, L.K., and Hu, W.-S. (2004). Three-dimensional co-culture of hepatocytes and stellate cells. *Cytotechnology* *45*, 125–140.

Abu-Amara, M., Yang, S.Y., Tapuria, N., Fuller, B., Davidson, B., and Seifalian, A. (2010). Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* *16*, 1016–1032.

Adachi, Y., Bradford, B.U., Gao, W., Bojes, H.K., and Thurman, R.G. (1994). Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* *20*, 453–460.

Adams, D.H., and Eksteen, B. (2006). Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 244–251.

Afdhal, N.H., and Nunes, D. (2004). Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am. J. Gastroenterol.* *99*, 1160–1174.

Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N., and Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* *20*, 319–325.

Albanis, E., and Friedman, S.L. (2001). Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin. Liver Dis.* *5*, 315–334, v – vi.

Alter, M.J. (1997). Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* *26*, 62S – 65S.

Andrei, C., Margiocco, P., Poggi, A., Lotti, L.V., Torrisi, M.R., and Rubartelli, A. (2004). Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9745–9750.

Anstee, Q.M., and Goldin, R.D. (2006). Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int. J. Exp. Pathol.* *87*, 1–16.

Antoniades, C.G., Khamri, W., Abeles, R.D., Taams, L.S., Triantafyllou, E., Possamai, L.A., Bernsmeier, C., Mitry, R.R., O'Brien, A., Gilroy, D., et al. (2014). Secretory leukocyte

protease inhibitor: a pivotal mediator of anti-inflammatory responses in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatology*. Baltimore, Md 59, 1564–1576.

Aparicio-Bautista, D.I., Pérez-Carreón, J.I., Gutiérrez-Nájera, N., Reyes-Grajeda, J.P., Arellanes-Robledo, J., Vásquez-Garzón, V.R., Jiménez-García, M.N., and Villa-Treviño, S. (2013). Comparative proteomic analysis of thiol proteins in the liver after oxidative stress induced by diethylnitrosamine. *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 2528–2538.

Areschoug, T., and Gordon, S. (2008). Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. *Contrib. Microbiol.* 15, 45–60.

Aronson, D.C., Chamuleau, R.A., Frederiks, W.M., Gooszen, H.G., Heijmans, H.S., and James, J. (1993). Reversibility of cholestatic changes following experimental common bile duct obstruction: fact or fantasy? *J. Hepatology*. 18, 85–95.

Arsov, T., Larter, C.Z., Nolan, C.J., Petrovsky, N., Goodnow, C.C., Teoh, N.C., Yeh, M.M., and Farrell, G.C. (2006). Adaptive failure to high-fat diet characterizes steatohepatitis in *Alms1* mutant mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 1152–1159.

Arthur, M.J., Friedman, S.L., Roll, F.J., and Bissell, D.M. (1989). Lipocytes from normal rat liver release a neutral metalloproteinase that degrades basement membrane (type IV) collagen. *J. Clin. Invest.* 84, 1076–1085.

Arthur, M.J., Stanley, A., Iredale, J.P., Rafferty, J.A., Hembry, R.M., and Friedman, S.L. (1992). Secretion of 72 kDa type IV collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes. Analysis of gene expression, protein synthesis and proteinase activity. *Biochem. J.* 287 ( Pt 3), 701–707.

Asahina, K., Sato, H., Yamasaki, C., Kataoka, M., Shiokawa, M., Katayama, S., Tateno, C., and Yoshizato, K. (2002). Pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule as a mitogen of rat hepatocytes and its role in regeneration and development of liver. *Am. J. Pathol.* 160, 2191–2205.

Ayala, J.M., Yamin, T.T., Egger, L.A., Chin, J., Kostura, M.J., and Miller, D.K. (1994). IL-1 beta-converting enzyme is present in monocytic cells as an inactive 45-kDa precursor. *J. Immunol.* Baltimore, Md 150 153, 2592–2599.

Bachem, M.G., Melchior, R., and Gressner, A.M. (1989). The role of thrombocytes in liver fibrogenesis: effects of platelet lysate and thrombocyte-derived growth factors on the mitogenic activity and glycosaminoglycan synthesis of cultured rat liver fat storing cells. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem. Z. Für Klin. Chem. Klin. Biochem.* 27, 555–565.

Bai, T., Lian, L.-H., Wu, Y.-L., Wan, Y., and Nan, J.-X. (2013). Thymoquinone attenuates liver fibrosis via PI3K and TLR4 signaling pathways in activated hepatic stellate cells. *Int. Immunopharmacol.* 15, 275–281.

Bartley, P.B., Ramm, G.A., Jones, M.K., Ruddell, R.G., Li, Y., and McManus, D.P. (2006). A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. *Int. J. Parasitol.* 36, 993–1001.

Başar, O., Yimaz, B., Ekiz, F., Giniş, Z., Altınbaş, A., Aktaş, B., Tuna, Y., Çoban, S., Delibaş, N., and Yüksel, O. (2013). Non-invasive tests in prediction of liver fibrosis in

chronic hepatitis B and comparison with post-antiviral treatment results. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 37, 152–158.

Basu, S. (2003). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 113–127.

Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., et al. (2009). Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 787–791.

Bedossa, P., Dargère, D., and Paradis, V. (2003). Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 38, 1449–1457.

Beier, J.I., and McClain, C.J. (2010). Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease. *Biol. Chem.* 391, 1249–1264.

Berenguer, M., and Schuppan, D. (2013). Progression of liver fibrosis in post-transplant hepatitis C: mechanisms, assessment and treatment. *J. Hepatology* 58, 1028–1041.

Beschin, A., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J.A. (2013). Contribution of myeloid cell subsets to liver fibrosis in parasite infection. *J. Pathol.* 229, 186–197.

Best, C.H., and Hartroft, W.S. (1949). Liver damage produced by feeding alcohol or sugar and its prevention by choline. *Br. Med. J.* 2, 1002–1006, pl.

Bhatia, S.N., Balis, U.J., Yarmush, M.L., and Toner, M. (1999). Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 13, 1883–1900.

Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1–5.

Bieghs, V., Hendriks, T., van Gorp, P.J., Verheyen, F., Guichot, Y.D., Walenbergh, S.M.A., Jeurissen, M.L.J., Gijbels, M., Rensen, S.S., Bast, A., et al. (2013). The cholesterol derivative 27-hydroxycholesterol reduces steatohepatitis in mice. *Gastroenterology* 144, 167–178.e1.

Bissell, D.M., Arenson, D.M., Maher, J.J., and Roll, F.J. (1987). Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J. Clin. Invest.* 79, 801–812.

Bissell, D.M., Wang, S.S., Jarnagin, W.R., and Roll, F.J. (1995). Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J. Clin. Invest.* 96, 447–455.

Blaner, W.S., O’Byrne, S.M., Wongsiriroj, N., Kluwe, J., D’Ambrosio, D.M., Jiang, H., Schwabe, R.F., Hillman, E.M.C., Piantedosi, R., and Libien, J. (2009). Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 467–473.



- Boaru, S.G., Borkham-Kamphorst, E., Tihaa, L., Haas, U., and Weiskirchen, R. (2012). Expression analysis of inflammasomes in experimental models of inflammatory and fibrotic liver disease. *J. Inflamm. Lond. Engl.* *9*, 49.
- Boeker, K.H.W., Haberkorn, C.I., Michels, D., Flemming, P., Manns, M.P., and Lichtinghagen, R. (2002). Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *316*, 71–81.
- Bonacchi, A., Romagnani, P., Romanelli, R.G., Efsen, E., Annunziato, F., Lasagni, L., Francalanci, M., Serio, M., Laffi, G., Pinzani, M., et al. (2001). Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J. Biol. Chem.* *276*, 9945–9954.
- Bonacchi, A., Petrai, I., Defranco, R.M.S., Lazzeri, E., Annunziato, F., Efsen, E., Cosmi, L., Romagnani, P., Milani, S., Failli, P., et al. (2003). The chemokine CCL21 modulates lymphocyte recruitment and fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* *125*, 1060–1076.
- Bonecchi, R., Facchetti, F., Dusi, S., Luini, W., Lissandrini, D., Simmelink, M., Locati, M., Bernasconi, S., Allavena, P., Brandt, E., et al. (2000). Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 3862–3869.
- di Bonzo, L.V., Ferrero, I., Cravanzola, C., Mareschi, K., Rustichell, D., Novo, E., Sanavio, F., Cannito, S., Zamara, E., Bertero, M., et al. (2008). Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut* *57*, 223–231.
- Borkham-Kamphorst, E., van Roeyen, C.R.C., Ostendorf, T., Floege, J., Gressner, A.M., and Weiskirchen, R. (2007). Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *J. Hepatol.* *46*, 1064–1074.
- Borojevic, R., Monteiro, A.N., Vinhas, S.A., Domont, G.B., Mourão, P.A., Emonard, H., Grimaldi, G., and Grimaud, J.A. (1985). Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.* *21*, 382–390.
- Botella, L.M., Sánchez-Elsner, T., Sanz-Rodriguez, F., Kojima, S., Shimada, J., Guerrero-Esteo, M., Cooreman, M.P., Ratziu, V., Langa, C., Vary, C.P.H., et al. (2002). Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* *100*, 4001–4010.
- Bours, M.J.L., Dagnelie, P.C., Giuliani, A.L., Wesselius, A., and Di Virgilio, F. (2011). P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. *Front. Biosci. Sch. Ed.* *3*, 1443–1456.
- van de Bovenkamp, M., Groothuis, G.M.M., Meijer, D.K.F., and Olinga, P. (2006). Precision-cut fibrotic rat liver slices as a new model to test the effects of anti-fibrotic drugs in vitro. *J. Hepatol.* *45*, 696–703.

- Boyden, E.D., and Dietrich, W.F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat. Genet.* 38, 240–244.
- Brandon-Warner, E., Schrum, L.W., Schmidt, C.M., and McKillop, I.H. (2012). Rodent models of alcoholic liver disease: of mice and men. *Alcohol Fayettev. N* 46, 715–725.
- Brown, B., Lindberg, K., Reing, J., Stolz, D.B., and Badylak, S.F. (2006). The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng.* 12, 519–526.
- Bruck, R., Shirin, H., Hershkoviz, R., Lider, O., Kenet, G., Aeed, H., Matas, Z., Zaidel, L., and Halpern, Z. (1997). Analysis of Arg-Gly-Asp mimetics and soluble receptor of tumour necrosis factor as therapeutic modalities for concanavalin A induced hepatitis in mice. *Gut* 40, 133–138.
- Buchmann, A., Bauer-Hofmann, R., Mahr, J., Drinkwater, N.R., Luz, A., and Schwarz, M. (1991). Mutational activation of the c-Ha-ras gene in liver tumors of different rodent strains: correlation with susceptibility to hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 911–915.
- Burdette, D., Haskett, A., Presser, L., McRae, S., Iqbal, J., and Waris, G. (2012). Hepatitis C virus activates interleukin-1 $\beta$  via caspase-1-inflammasome complex. *J. Gen. Virol.* 93, 235–246.
- Byun, J.-S., Suh, Y.-G., Yi, H.-S., Lee, Y.-S., and Jeong, W.-I. (2013). Activation of toll-like receptor 3 attenuates alcoholic liver injury by stimulating Kupffer cells and stellate cells to produce interleukin-10 in mice. *J. Hepatol.* 58, 342–349.
- Cadranel, J.F., Rufat, P., and Degos, F. (2000). Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF). *Hepatol. Baltim. Md* 32, 477–481.
- Canbay, A., Taimr, P., Torok, N., Higuchi, H., Friedman, S., and Gores, G.J. (2003). Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 83, 655–663.
- Cao, Q., Mak, K.M., and Lieber, C.S. (2006). Leptin enhances alpha1(I) collagen gene expression in LX-2 human hepatic stellate cells through JAK-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent MAPK pathways. *J. Cell. Biochem.* 97, 188–197.
- Case, C.L., Shin, S., and Roy, C.R. (2009). Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 77, 1981–1991.
- Casini, A., Pellegrini, G., Ceni, E., Salzano, R., Parola, M., Robino, G., Milani, S., Dianzani, M.U., and Surrenti, C. (1998). Human hepatic stellate cells express class I alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase but not cytochrome P450E1. *J. Hepatol.* 28, 40–45.
- Chan, K.-M., Fu, Y.-H., Wu, T.-J., Hsu, P.-Y., and Lee, W.-C. (2013). Hepatic stellate cells promote the differentiation of embryonic stem cell-derived definitive endodermal cells into hepatic progenitor cells. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* 43, 648–657.

- Chang, M.-L., Yeh, C.-T., Chang, P.-Y., and Chen, J.-C. (2005). Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation. *World J. Gastroenterol.* *11*, 4167–4172.
- Chang, W., Yang, M., Song, L., Shen, K., Wang, H., Gao, X., Li, M., Niu, W., and Qin, X. (2014). Isolation and culture of hepatic stellate cells from mouse liver. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *46*, 291–298.
- Chattergoon, M.A., Latanich, R., Quinn, J., Winter, M.E., Buckheit, R.W., Blankson, J.N., Pardoll, D., and Cox, A.L. (2014). HIV and HCV activate the inflammasome in monocytes and macrophages via endosomal Toll-like receptors without induction of type 1 interferon. *PLoS Pathog.* *10*, e1004082.
- Cheever, A.W., Duvall, R.H., Hallack, T.A., Minker, R.G., Malley, J.D., and Malley, K.G. (1987). Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *37*, 85–97.
- Cheever, A.W., Lenzi, J.A., Lenzi, H.L., and Andrade, Z.A. (2002). Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *97*, 917–940.
- Chen, S., and Sun, B. (2013). Negative regulation of NLRP3 inflammasome signaling. *Protein Cell* *4*, 251–258.
- Chen, C.-J., Kono, H., Golenbock, D., Reed, G., Akira, S., and Rock, K.L. (2007). Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat. Med.* *13*, 851–856.
- Chen, I.-S., Chen, Y.-C., Chou, C.-H., Chuang, R.-F., Sheen, L.-Y., and Chiu, C.-H. (2012a). Hepatoprotection of silymarin against thioacetamide-induced chronic liver fibrosis. *J. Sci. Food Agric.* *92*, 1441–1447.
- Chen, L., Zhang, W., Zhou, Q., Yang, H., Liang, H., Zhang, B., Long, X., and Chen, X. (2012b). HSCs play a distinct role in different phases of oval cell-mediated liver regeneration. *Cell Biochem. Funct.* *30*, 588–596.
- Chen, W., Xu, Y., Li, H., Tao, W., Xiang, Y., Huang, B., Niu, J., Zhong, J., and Meng, G. (2014). HCV genomic RNA activates the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *PLoS One* *9*, e84953.
- Chiaromonte, M.G., Cheever, A.W., Malley, J.D., Donaldson, D.D., and Wynn, T.A. (2001). Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology* *34*, 273–282.
- Chisari, F.V., Filippi, P., McLachlan, A., Milich, D.R., Riggs, M., Lee, S., Palmiter, R.D., Pinkert, C.A., and Brinster, R.L. (1986). Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. *J. Virol.* *60*, 880–887.
- Clemens, D.L. (2006). Use of cultured cells to study alcohol metabolism. *Alcohol Res. Health J. Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.* *29*, 291–295.

- Clément, S., Pascarella, S., Conzelmann, S., Gonelle-Gispert, C., Guilloux, K., and Negro, F. (2010). The hepatitis C virus core protein indirectly induces alpha-smooth muscle actin expression in hepatic stellate cells via interleukin-8. *J. Hepatol.* *52*, 635–643.
- Cogger, V.C., McNerney, G.P., Nyunt, T., DeLeve, L.D., McCourt, P., Smedsrød, B., Le Couteur, D.G., and Huser, T.R. (2010). Three-dimensional structured illumination microscopy of liver sinusoidal endothelial cell fenestrations. *J. Struct. Biol.* *171*, 382–388.
- Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* *332*, 1519–1523.
- Constandinou, C., Henderson, N., and Iredale, J.P. (2005). Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol. Med.* *117*, 237–250.
- Coulouarn, C., Corlu, A., Glaise, D., Guénon, I., Thorgeirsson, S.S., and Clément, B. (2012). Hepatocyte-stellate cell cross-talk in the liver engenders a permissive inflammatory microenvironment that drives progression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* *72*, 2533–2542.
- Csak, T., Ganz, M., Pespisa, J., Kodys, K., Dolganiuc, A., and Szabo, G. (2011a). Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology* *54*, 133–144.
- Csak, T., Velayudham, A., Hritz, I., Petrasek, J., Levin, I., Lippai, D., Catalano, D., Mandrekar, P., Dolganiuc, A., Kurt-Jones, E., et al. (2011b). Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and toll-like receptor 4 expression attenuates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *300*, G433–G441.
- Csak, T., Pillai, A., Ganz, M., Lippai, D., Petrasek, J., Park, J.-K., Kodys, K., Dolganiuc, A., Kurt-Jones, E.A., and Szabo, G. (2014). Both bone marrow-derived and non-bone marrow-derived cells contribute to AIM2 and NLRP3 inflammasome activation in a MyD88-dependent manner in dietary steatohepatitis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* *34*, 1402–1413.
- Dapito, D.H., Mencin, A., Gwak, G.-Y., Pradere, J.-P., Jang, M.-K., Mederacke, I., Caviglia, J.M., Khiabanian, H., Adeyemi, A., Bataller, R., et al. (2012). Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell* *21*, 504–516.
- Datz, C., Cramp, M., Haas, T., Dietze, O., Nitschko, H., Froesner, G., Muss, N., Sandhofer, F., and Vogel, W. (1999). The natural course of hepatitis C virus infection 18 years after an epidemic outbreak of non-A, non-B hepatitis in a plasmapheresis centre. *Gut* *44*, 563–567.
- Davies, L.C., Rosas, M., Jenkins, S.J., Liao, C.-T., Scurr, M.J., Brombacher, F., Fraser, D.J., Allen, J.E., Jones, S.A., and Taylor, P.R. (2013). Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat. Commun.* *4*, 1886.
- Davis, B.K., Wen, H., and Ting, J.P.-Y. (2011). The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 707–735.

- Davis, G.L., Albright, J.E., Cook, S.F., and Rosenberg, D.M. (2003). Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* 9, 331–338.
- Davis, L.G., Weber, D.J., and Lemon, S.M. (1989). Horizontal transmission of hepatitis B virus. *Lancet Lond. Engl.* 1, 889–893.
- De Bleser, P.J., Niki, T., Rogiers, V., and Geerts, A. (1997). Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J. Hepatol.* 26, 886–893.
- DeCarli, L.M., and Lieber, C.S. (1967). Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet. *J. Nutr.* 91, 331–336.
- Degertekin, B., and Lok, A.S.F. (2009). Update on viral hepatitis: 2008. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25, 180–185.
- DeLeve, L.D., Wang, X., Hu, L., McCuskey, M.K., and McCuskey, R.S. (2004). Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G757–G763.
- De Minicis, S., and Brenner, D.A. (2007). NOX in liver fibrosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 266–272.
- De Minicis, S., Seki, E., Uchinami, H., Kluwe, J., Zhang, Y., Brenner, D.A., and Schwabe, R.F. (2007). Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* 132, 1937–1946.
- De Minicis, S., Agostinelli, L., Rychlicki, C., Sorice, G.P., Saccomanno, S., Candelaresi, C., Giaccari, A., Trozzi, L., Pierantonelli, I., Mingarelli, E., et al. (2014). HCC development is associated to peripheral insulin resistance in a mouse model of NASH. *PloS One* 9, e97136.
- Denda, A., Kitayama, W., Kishida, H., Murata, N., Tsutsumi, M., Tsujiuchi, T., Nakae, D., and Konishi, Y. (2002). Development of hepatocellular adenomas and carcinomas associated with fibrosis in C57BL/6J male mice given a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 93, 125–132.
- Dinarello, C.A. (2009). Interleukin-1beta and the autoinflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 360, 2467–2470.
- Dinarello, C.A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117, 3720–3732.
- Dinarello, C.A., Ikejima, T., Warner, S.J., Orencole, S.F., Lonnemann, G., Cannon, J.G., and Libby, P. (1987). Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md* 139, 1902–1910.
- Dixon, L.J., Flask, C.A., Papouchado, B.G., Feldstein, A.E., and Nagy, L.E. (2013). Caspase-1 as a central regulator of high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *PloS One* 8, e56100.

- Dolganiuc, A., Norkina, O., Kodys, K., Catalano, D., Bakis, G., Marshall, C., Mandrekar, P., and Szabo, G. (2007). Viral and host factors induce macrophage activation and loss of toll-like receptor tolerance in chronic HCV infection. *Gastroenterology* *133*, 1627–1636.
- Domenicali, M., Caraceni, P., Giannone, F., Baldassarre, M., Lucchetti, G., Quarta, C., Patti, C., Catani, L., Nanni, C., Lemoli, R.M., et al. (2009). A novel model of CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis with ascites in the mouse. *J. Hepatol.* *51*, 991–999.
- Dooley, S., Delvoux, B., Lahme, B., Mangasser-Stephan, K., and Gressner, A.M. (2000). Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatol. Baltim. Md* *31*, 1094–1106.
- Dostert, C., Pétrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T., and Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* *320*, 674–677.
- DuBray, B.J., Conzen, K.D., Upadhyya, G.A., Gunter, K.L., Jia, J., Knolhoff, B.L., Mohanakumar, T., Chapman, W.C., and Anderson, C.D. (2015). BH3-only proteins contribute to steatotic liver ischemia-reperfusion injury. *J. Surg. Res.* *194*, 653–658.
- Duffield, J.S., Forbes, S.J., Constandinou, C.M., Clay, S., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Lang, R., and Iredale, J.P. (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. Invest.* *115*, 56–65.
- Duncan, A.W. (2013). Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Semin. Cell Dev. Biol.* *24*, 347–356.
- Edwards, M.J., Keller, B.J., Kauffman, F.C., and Thurman, R.G. (1993). The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *119*, 275–279.
- Ekstedt, M., Franzén, L.E., Mathiesen, U.L., Thorelius, L., Holmqvist, M., Bodemar, G., and Kechagias, S. (2006). Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatol. Baltim. Md* *44*, 865–873.
- Enomoto, N., Ikejima, K., Bradford, B., Rivera, C., Kono, H., Brenner, D.A., and Thurman, R.G. (1998). Alcohol causes both tolerance and sensitization of rat Kupffer cells via mechanisms dependent on endotoxin. *Gastroenterology* *115*, 443–451.
- Erwig, L.P., Kluth, D.C., Walsh, G.M., and Rees, A.J. (1998). Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. *J. Immunol. Baltim. Md* *161*, 1983–1988.
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A.J., and Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *105*, 141–150.
- Fabris, P., Baldo, V., Baldovin, T., Bellotto, E., Rassa, M., Trivello, R., Tramarin, A., Tositti, G., and Floreani, A. (2008). Changing epidemiology of HCV and HBV infections in Northern Italy: a survey in the general population. *J. Clin. Gastroenterol.* *42*, 527–532.

- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson, P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* *101*, 890–898.
- Fallowfield, J.A., Mizuno, M., Kendall, T.J., Constandinou, C.M., Benyon, R.C., Duffield, J.S., and Iredale, J.P. (2007). Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 5288–5295.
- Farrell, G.C., Teoh, N.C., and McCuskey, R.S. (2008). Hepatic microcirculation in fatty liver disease. *Anat. Rec. Hoboken NJ 2007* *291*, 684–692.
- Farrell, G.C., Mridha, A.R., Yeh, M.M., Arsov, T., Van Rooyen, D.M., Brooling, J., Nguyen, T., Heydet, D., Delghingaro-Augusto, V., Nolan, C.J., et al. (2014). Strain dependence of diet-induced NASH and liver fibrosis in obese mice is linked to diabetes and inflammatory phenotype. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* *34*, 1084–1093.
- Fausther, M., Goree, J.R., Lavoie, É.G., Graham, A.L., Sévigny, J., and Dranoff, J.A. (2015). Establishment and characterization of rat portal myofibroblast cell lines. *PloS One* *10*, e0121161.
- Fibbi, G., Pucci, M., D'Alessio, S., Grappone, C., Pellegrini, G., Salzano, R., Casini, A., Milani, S., and Del Rosso, M. (2001). Transforming growth factor beta-1 stimulates invasivity of hepatic stellate cells by engagement of the cell-associated fibrinolytic system. *Growth Factors Chur Switz.* *19*, 87–100.
- Fickert, P., Zollner, G., Fuchsbichler, A., Stumtner, C., Weiglein, A.H., Lammert, F., Marschall, H.-U., Tsybrovskyy, O., Zatloukal, K., Denk, H., et al. (2002). Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and Mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles. *Gastroenterology* *123*, 1238–1251.
- Fickert, P., Fuchsbichler, A., Wagner, M., Zollner, G., Kaser, A., Tilg, H., Krause, R., Lammert, F., Langner, C., Zatloukal, K., et al. (2004). Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* *127*, 261–274.
- Fisher, R.L., and Vickers, A.E.M. (2013). Preparation and culture of precision-cut organ slices from human and animal. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* *43*, 8–14.
- Forbes, S., Vig, P., Poulsom, R., Thomas, H., and Alison, M. (2002). Hepatic stem cells. *J. Pathol.* *197*, 510–518.
- Forbes, S.J., Russo, F.P., Rey, V., Burra, P., Rugge, M., Wright, N.A., and Alison, M.R. (2004). A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* *126*, 955–963.
- Fortuna, V.A., Trugo, L.C., and Borojevic, R. (2001). Acyl-CoA: retinol acyltransferase (ARAT) and lecithin:retinol acyltransferase (LRAT) activation during the lipocyte phenotype induction in hepatic stellate cells. *J. Nutr. Biochem.* *12*, 610–621.

- Fowell, A.J., Collins, J.E., Duncombe, D.R., Pickering, J.A., Rosenberg, W.M.C., and Benyon, R.C. (2011). Silencing tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) with short interfering RNA reveals a role for TIMP-1 in hepatic stellate cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *407*, 277–282.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T.-D., Ozören, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., et al. (2006). Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat. Immunol.* *7*, 576–582.
- French, S.W. (2001). Intra-gastric ethanol infusion model for cellular and molecular studies of alcoholic liver disease. *J. Biomed. Sci.* *8*, 20–27.
- Friedman, S.L. (2008a). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* *88*, 125–172.
- Friedman, S.L. (2008b). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* *134*, 1655–1669.
- Friedman, S.L. (2012). Fibrogenic cell reversion underlies fibrosis regression in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 9230–9231.
- Friedman, S.L., and Arthur, M.J. (1989). Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J. Clin. Invest.* *84*, 1780–1785.
- Friedman, S.L., Roll, F.J., Boyles, J., Arenson, D.M., and Bissell, D.M. (1989). Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix. *J. Biol. Chem.* *264*, 10756–10762.
- Friedman, S.L., Yamasaki, G., and Wong, L. (1994). Modulation of transforming growth factor beta receptors of rat lipocytes during the hepatic wound healing response. Enhanced binding and reduced gene expression accompany cellular activation in culture and in vivo. *J. Biol. Chem.* *269*, 10551–10558.
- Frizell, E., Liu, S.L., Abraham, A., Ozaki, I., Eghbali, M., Sage, E.H., and Zern, M.A. (1995). Expression of SPARC in normal and fibrotic livers. *Hepatol. Baltim. Md* *21*, 847–854.
- Fujikawa, K., Shiraki, K., Sugimoto, K., Ito, T., Yamanaka, T., Takase, K., and Nakano, T. (2000). Reduced expression of ICE/caspase1 and CPP32/caspase3 in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* *20*, 1927–1932.
- Fujio, K., Evarts, R.P., Hu, Z., Marsden, E.R., and Thorgeirsson, S.S. (1994). Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* *70*, 511–516.
- Gabrielli, M., Moisan, F., Vidal, M., Duarte, I., Jiménez, M., Izquierdo, G., Domínguez, P., Méndez, J., Soza, A., Benitez, C., et al. (2012). Steatotic livers. Can we use them in OLTX? Outcome data from a prospective baseline liver biopsy study. *Ann. Hepatol.* *11*, 891–898.



- Gaça, M.D.A., Zhou, X., Issa, R., Kiriella, K., Iredale, J.P., and Benyon, R.C. (2003). Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 22, 229–239.
- Ganz, M., and Szabo, G. (2013). Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatology Int.* 7 Suppl 2, 771–781.
- Ganz, M., Csak, T., and Szabo, G. (2014). High fat diet feeding results in gender specific steatohepatitis and inflammasome activation. *World J. Gastroenterol.* 20, 8525–8534.
- Gao, B., and Bataller, R. (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 141, 1572–1585.
- Gao, R., and Brigstock, D.R. (2004). Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin  $\alpha(v)\beta(3)$  and heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 279, 8848–8855.
- Gao, B., Radaeva, S., and Park, O. (2009). Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *J. Leukoc. Biol.* 86, 513–528.
- Gao, B., Seki, E., Brenner, D.A., Friedman, S., Cohen, J.I., Nagy, L., Szabo, G., and Zakhari, S. (2011). Innate immunity in alcoholic liver disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G516–G525.
- Gasse, P., Mary, C., Guenon, I., Noulin, N., Charron, S., Schnyder-Candrian, S., Schnyder, B., Akira, S., Quesniaux, V.F.J., Lagente, V., et al. (2007). IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3786–3799.
- Ge, X., Antoine, D.J., Lu, Y., Arriazu, E., Leung, T.-M., Klepper, A.L., Branch, A.D., Fiel, M.I., and Nieto, N. (2014). High mobility group box-1 (HMGB1) participates in the pathogenesis of alcoholic liver disease (ALD). *J. Biol. Chem.* 289, 22672–22691.
- Geerts, A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* 21, 311–335.
- Geerts, A., Vrijssen, R., Rauterberg, J., Burt, A., Schellinck, P., and Wisse, E. (1989). In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. *J. Hepatol.* 9, 59–68.
- Geerts, A., Lazou, J.M., De Bleser, P., and Wisse, E. (1991). Tissue distribution, quantitation and proliferation kinetics of fat-storing cells in carbon tetrachloride-injured rat liver. *Hepatology. Baltim. Md* 13, 1193–1202.
- Geerts, A., Niki, T., Hellemans, K., De Craemer, D., Van Den Berg, K., Lazou, J.M., Stange, G., Van De Winkel, M., and De Bleser, P. (1998). Purification of rat hepatic stellate cells by side scatter-activated cell sorting. *Hepatology. Baltim. Md* 27, 590–598.
- Geerts, A.M., Vanheule, E., Praet, M., Van Vlierberghe, H., De Vos, M., and Colle, I. (2008). Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *Int. J. Exp. Pathol.* 89, 251–263.

- Gehring, S., Dickson, E.M., San Martin, M.E., van Rooijen, N., Papa, E.F., Harty, M.W., Tracy, T.F., and Gregory, S.H. (2006). Kupffer cells abrogate cholestatic liver injury in mice. *Gastroenterology* *130*, 810–822.
- Georgiev, P., Jochum, W., Heinrich, S., Jang, J.H., Nocito, A., Dahm, F., and Clavien, P.-A. (2008). Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br. J. Surg.* *95*, 646–656.
- Gheorghe, L., Csiki, I.E., Iacob, S., Gheorghe, C., Smira, G., and Regep, L. (2010). The prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in adult population in Romania: a nationwide survey 2006 - 2008. *J. Gastrointest. Liver Dis. JGLD* *19*, 373–379.
- Ghiassi-Nejad, Z., Hernandez-Gea, V., Woodrell, C., Lang, U.E., Dumic, K., Kwong, A., and Friedman, S.L. (2013). Reduced hepatic stellate cell expression of Kruppel-like factor 6 tumor suppressor isoforms amplifies fibrosis during acute and chronic rodent liver injury. *Hepatology* *57*, 786–796.
- Gibbons, M.A., MacKinnon, A.C., Ramachandran, P., Dhaliwal, K., Duffin, R., Phythian-Adams, A.T., van Rooijen, N., Haslett, C., Howie, S.E., Simpson, A.J., et al. (2011). Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *184*, 569–581.
- Gicquel, T., Robert, S., Loyer, P., Victoni, T., Bodin, A., Ribault, C., Gleonnec, F., Couillin, I., Boichot, E., and Lagente, V. (2015). IL-1 $\beta$  production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *29*, 4162–4173.
- Gieling, R.G., Wallace, K., and Han, Y.-P. (2009). Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *296*, G1324–G1331.
- Gil, M.L., and Gozalbo, D. (2006). TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* *8*, 2299–2304.
- Giraudi, P.J., Becerra, V.J.B., Marin, V., Chavez-Tapia, N.C., Tiribelli, C., and Rosso, N. (2015). The importance of the interaction between hepatocyte and hepatic stellate cells in fibrogenesis induced by fatty accumulation. *Exp. Mol. Pathol.* *98*, 85–92.
- Goldbach-Mansky, R., Dailey, N.J., Canna, S.W., Gelabert, A., Jones, J., Rubin, B.I., Kim, H.J., Brewer, C., Zalewski, C., Wiggs, E., et al. (2006). Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1 $\beta$  inhibition. *N. Engl. J. Med.* *355*, 581–592.
- Gong, Y., Hart, E., Shchurin, A., and Hoover-Plow, J. (2008). Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 3012–3024.
- Görbig, M.N., Ginès, P., Bataller, R., Nicolás, J.M., Garcia-Ramallo, E., Cejudo, P., Sancho-Bru, P., Jiménez, W., Arroyo, V., and Rodés, J. (2001). Human hepatic stellate cells secrete adrenomedullin: potential autocrine factor in the regulation of cell contractility. *J. Hepatology* *34*, 222–229.

- Gratchev, A., Kzhyshkowska, J., Köthe, K., Muller-Molinet, I., Kannookadan, S., Utikal, J., and Goerdts, S. (2006). Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology* 211, 473–486.
- Greenwel, P., Schwartz, M., Rosas, M., Peyrol, S., Grimaud, J.A., and Rojkind, M. (1991). Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl4-cirrhotic livers. Differences in the production of interleukin-6. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 65, 644–653.
- Greenwel, P., Rubin, J., Schwartz, M., Hertzberg, E.L., and Rojkind, M. (1993). Liver fat-storing cell clones obtained from a CCl4-cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, interleukin-6, and connexin 43. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 69, 210–216.
- Gressner, A.M., and Zerbe, O. (1987). Kupffer cell-mediated induction of synthesis and secretion of proteoglycans by rat liver fat-storing cells in culture. *J. Hepatol.* 5, 299–310.
- Gressner, O.A., and Gressner, A.M. (2008). Connective tissue growth factor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 28, 1065–1079.
- Gross, O., Thomas, C.J., Guarda, G., and Tschopp, J. (2011). The inflammasome: an integrated view. *Immunol. Rev.* 243, 136–151.
- Guimarães, E.L.M., Franceschi, M.F.S., Andrade, C.M.B., Guaragna, R.M., Borojevic, R., Margis, R., Bernard, E.A., and Guma, F.C.R. (2007). Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 27, 1255–1264.
- Guma FCR, null, Mello, T.G., Mermelstein, C.S., Fortuna, V.A., Wofchuk, S.T., Gottfried, C., Guaragna, R.M., Costa, M.L., and Borojevic, R. (2001). Intermediate filaments modulation in an in vitro model of the hepatic stellate cell activation or conversion into the lipocyte phenotype. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 79, 409–417.
- Guo, J., Loke, J., Zheng, F., Hong, F., Yea, S., Fukata, M., Tarocchi, M., Abar, O.T., Huang, H., Sninsky, J.J., et al. (2009a). Functional linkage of cirrhosis-predictive single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 4 to hepatic stellate cell responses. *Hepatology* 49, 960–968.
- Guo, J., Loke, J., Zheng, F., Hong, F., Yea, S., Fukata, M., Tarocchi, M., Abar, O.T., Huang, H., Sninsky, J.J., et al. (2009b). Functional linkage of cirrhosis-predictive single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 4 to hepatic stellate cell responses. *Hepatology* 49, 960–968.
- Guo, Y., Wang, H., and Zhang, C. (2007). Establishment of rat precision-cut fibrotic liver slice technique and its application in verapamil metabolism. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 406–413.
- Hahn, E., Wick, G., Pencev, D., and Timpl, R. (1980). Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin. *Gut* 21, 63–71.

- Han, Y.-P., Yan, C., Zhou, L., Qin, L., and Tsukamoto, H. (2007). A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* *282*, 12928–12939.
- Harada, H., Wakabayashi, G., Takayanagi, A., Shimazu, M., Matsumoto, K., Obara, H., Shimizu, N., and Kitajima, M. (2002). Transfer of the interleukin-1 receptor antagonist gene into rat liver abrogates hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* *74*, 1434–1441.
- Hartland, S.N., Murphy, F., Aucott, R.L., Abergel, A., Zhou, X., Waung, J., Patel, N., Bradshaw, C., Collins, J., Mann, D., et al. (2009). Active matrix metalloproteinase-2 promotes apoptosis of hepatic stellate cells via the cleavage of cellular N-cadherin. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* *29*, 966–978.
- Hayashi, H., and Sakai, T. (2011). Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *300*, G729–G738.
- Hayashidani, S., Tsutsui, H., Shiomi, T., Ikeuchi, M., Matsusaka, H., Suematsu, N., Wen, J., Egashira, K., and Takeshita, A. (2003). Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* *108*, 2134–2140.
- Heim, M.H. (2013). Innate immunity and HCV. *J. Hepatol.* *58*, 564–574.
- Heindryckx, F., Colle, I., and Van Vlierberghe, H. (2009). Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int. J. Exp. Pathol.* *90*, 367–386.
- Henaoui-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W.Z., Strowig, T., Thaiss, C.A., Kau, A.L., Eisenbarth, S.C., Jurczak, M.J., et al. (2012). Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* *482*, 179–185.
- Hendriks, H.F., Verhoofstad, W.A., Brouwer, A., de Leeuw, A.M., and Knook, D.L. (1985). Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exp. Cell Res.* *160*, 138–149.
- Herbert, D.R., Hölscher, C., Mohrs, M., Arendse, B., Schwegmann, A., Radwanska, M., Leeto, M., Kirsch, R., Hall, P., Mossman, H., et al. (2004). Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* *20*, 623–635.
- Herrmann, J., Gressner, A.M., and Weiskirchen, R. (2007). Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *J. Cell. Mol. Med.* *11*, 704–722.
- Heymann, F., Trautwein, C., and Tacke, F. (2009). Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis. *Inflamm. Allergy Drug Targets* *8*, 307–318.
- Hirata, M., Akbar, S.M., Horiike, N., and Onji, M. (2001). Noninvasive diagnosis of the degree of hepatic fibrosis using ultrasonography in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus. *Eur. J. Clin. Invest.* *31*, 528–535.
- Hoek, J.B., Cahill, A., and Pastorino, J.G. (2002). Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology* *122*, 2049–2063.

- Hoffman, H.M., Mueller, J.L., Broide, D.H., Wanderer, A.A., and Kolodner, R.D. (2001). Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat. Genet.* 29, 301–305.
- Holt, A.P., Salmon, M., Buckley, C.D., and Adams, D.H. (2008a). Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin. Liver Dis.* 12, 861–882, x.
- Holt, A.P., Haughton, E.L., Lalor, P.F., Filer, A., Buckley, C.D., and Adams, D.H. (2009). Liver myofibroblasts regulate infiltration and positioning of lymphocytes in human liver. *Gastroenterology* 136, 705–714.
- Holt, D.J., Chamberlain, L.M., and Grainger, D.W. (2010). Cell-cell signaling in co-cultures of macrophages and fibroblasts. *Biomaterials* 31, 9382–9394.
- Holt, M.P., Cheng, L., and Ju, C. (2008b). Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. *J. Leukoc. Biol.* 84, 1410–1421.
- Hong, F., Tuyama, A., Lee, T.F., Loke, J., Agarwal, R., Cheng, X., Garg, A., Fiel, M.I., Schwartz, M., Walewski, J., et al. (2009). Hepatic stellate cells express functional CXCR4: role in stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ -mediated stellate cell activation. *Hepatology* 49, 2055–2067.
- Hoque, R., Sohail, M.A., Salhanick, S., Malik, A.F., Ghani, A., Robson, S.C., and Mehal, W.Z. (2012). P2X7 receptor-mediated purinergic signaling promotes liver injury in acetaminophen hepatotoxicity in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302, G1171–G1179.
- Horie, S., Kitamura, Y., Kawasaki, H., and Terada, T. (2000). Inhibitory effects of antisense oligonucleotides on the expression of procollagen type III gene in mouse hepatic stellate cells transformed by simian virus 40. *Pathol. Int.* 50, 937–944.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9, 847–856.
- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D.R., Latz, E., and Fitzgerald, K.A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458, 514–518.
- Hou, G., Dick, R., and Brewer, G.J. (2009). Improvement in dissolution of liver fibrosis in an animal model by tetrathiomolybdate. *Exp. Biol. Med.* 234, 662–665.
- Hsieh, C.-C., Chou, H.-S., Fung, J.J., Qian, S., and Lu, L. (2010). The role of liver stromal cells in dendritic cells development in mice. *Transplant. Proc.* 42, 4279–4281.
- Huang, G., and Brigstock, D.R. (2011). Integrin expression and function in the response of primary culture hepatic stellate cells to connective tissue growth factor (CCN2). *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1087–1095.
- Huang, G., and Brigstock, D.R. (2012). Regulation of hepatic stellate cells by connective tissue growth factor. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 17, 2495–2507.

Huang, H., Chen, H.-W., Evankovich, J., Yan, W., Rosborough, B.R., Nace, G.W., Ding, Q., Loughran, P., Beer-Stolz, D., Billiar, T.R., et al. (2013). Histones activate the NLRP3 inflammasome in Kupffer cells during sterile inflammatory liver injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 2665–2679.

Hyams, K.C. (1995). Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *20*, 992–1000.

Ichimura, M., Kawase, M., Masuzumi, M., Sakaki, M., Nagata, Y., Tanaka, K., Suruga, K., Tamaru, S., Kato, S., Tsuneyama, K., et al. (2015). High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague-Dawley rats. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* *45*, 458–469.

Ide, M., Kuwamura, M., Kotani, T., Sawamoto, O., and Yamate, J. (2005). Effects of gadolinium chloride (GdCl<sub>3</sub>) on the appearance of macrophage populations and fibrogenesis in thioacetamide-induced rat hepatic lesions. *J. Comp. Pathol.* *133*, 92–102.

Ignotz, R.A., and Massagué, J. (1986). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* *261*, 4337–4345.

Iimuro, Y., Nishio, T., Morimoto, T., Nitta, T., Stefanovic, B., Choi, S.K., Brenner, D.A., and Yamaoka, Y. (2003). Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. *Gastroenterology* *124*, 445–458.

Ikeda, K., Wakahara, T., Wang, Y.Q., Kadoya, H., Kawada, N., and Kaneda, K. (1999). In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatol. Baltim. Md* *29*, 1760–1767.

Imaeda, A.B., Watanabe, A., Sohail, M.A., Mahmood, S., Mohamadnejad, M., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., and Mehal, W.Z. (2009). Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J. Clin. Invest.* *119*, 305–314.

Imamura, M., Ogawa, T., Sasaguri, Y., Chayama, K., and Ueno, H. (2005). Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology* *128*, 138–146.

Inokuchi, S., Tsukamoto, H., Park, E., Liu, Z.-X., Brenner, D.A., and Seki, E. (2011). Toll-like receptor 4 mediates alcohol-induced steatohepatitis through bone marrow-derived and endogenous liver cells in mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *35*, 1509–1518.

Inoue, Y., Shirasuna, K., Kimura, H., Usui, F., Kawashima, A., Karasawa, T., Tago, K., Dezaki, K., Nishimura, S., Sagara, J., et al. (2014). NLRP3 regulates neutrophil functions and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury independently of inflammasomes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 4342–4351.

Iredale, J.P. (2007). Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J. Clin. Invest.* *117*, 539–548.

Ishibashi, H., Komori, A., Shimoda, S., and Gershwin, M.E. (2007). Guidelines for therapy of autoimmune liver disease. *Semin. Liver Dis.* *27*, 214–226.

- Ishikawa, K., Mochida, S., Mashiba, S., Inao, M., Matsui, A., Ikeda, H., Ohno, A., Shibuya, M., and Fujiwara, K. (1999). Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *254*, 587–593.
- Isono, M., Soda, M., Inoue, A., Akiyoshi, H., and Sato, K. (2003). Reverse transformation of hepatic myofibroblast-like cells by TGFbeta1/LAP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *311*, 959–965.
- Itagaki, H., Shimizu, K., Morikawa, S., Ogawa, K., and Ezaki, T. (2013). Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *6*, 2683–2696.
- Ito, M., Suzuki, J., Tsujioka, S., Sasaki, M., Gomori, A., Shirakura, T., Hirose, H., Ito, M., Ishihara, A., Iwaasa, H., et al. (2007). Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* *37*, 50–57.
- Iwaisako, K., Jiang, C., Zhang, M., Cong, M., Moore-Morris, T.J., Park, T.J., Liu, X., Xu, J., Wang, P., Paik, Y.-H., et al. (2014). Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E3297–E3305.
- Iyanagi, T. (2007). Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *Int. Rev. Cytol.* *260*, 35–112.
- Jaeschke, H. (2011). Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *26 Suppl 1*, 173–179.
- Jaeschke, H., Williams, C.D., and Farhood, A. (2011). No evidence for caspase-dependent apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatol. Baltim. Md* *53*, 718–719.
- Jaeschke, H., Williams, C.D., Ramachandran, A., and Bajt, M.L. (2012). Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* *32*, 8–20.
- Jancova, P., Anzenbacher, P., and Anzenbacherova, E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacký Olomouc Czechoslov.* *154*, 103–116.
- Jang, J.H., Kang, K.J., Kim, Y.H., Kang, Y.N., and Lee, I.S. (2008). Reevaluation of experimental model of hepatic fibrosis induced by hepatotoxic drugs: an easy, applicable, and reproducible model. *Transplant. Proc.* *40*, 2700–2703.
- Jarnagin, W.R., Rockey, D.C., Koteliansky, V.E., Wang, S.S., and Bissell, D.M. (1994). Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J. Cell Biol.* *127*, 2037–2048.
- Jenkins, S.J., Ruckerl, D., Cook, P.C., Jones, L.H., Finkelman, F.D., van Rooijen, N., MacDonald, A.S., and Allen, J.E. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* *332*, 1284–1288.

- Jha, P., Knopf, A., Koefeler, H., Mueller, M., Lackner, C., Hoefler, G., Claudel, T., and Trauner, M. (2014). Role of adipose tissue in methionine-choline-deficient model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 959–970.
- Jin, C., and Flavell, R.A. (2010). Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *J. Clin. Immunol.* 30, 628–631.
- Kageyama, Y., Ikeda, H., Watanabe, N., Nagamine, M., Kusumoto, Y., Yashiro, M., Satoh, Y., Shimosawa, T., Shinozaki, K., Tomiya, T., et al. (2012). Antagonism of sphingosine 1-phosphate receptor 2 causes a selective reduction of portal vein pressure in bile duct-ligated rodents. *Hepatology* 56, 1427–1438.
- Kamo, N., Ke, B., Ghaffari, A.A., Shen, X., Busuttil, R.W., Cheng, G., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2013). ASC/caspase-1/IL-1 $\beta$  signaling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 58, 351–362.
- Kang, N., Gores, G.J., and Shah, V.H. (2011). Hepatic stellate cells: partners in crime for liver metastases? *Hepatology* 54, 707–713.
- Kanneganti, T.-D., Lamkanfi, M., Kim, Y.-G., Chen, G., Park, J.-H., Franchi, L., Vandenabeele, P., and Núñez, G. (2007). Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* 26, 433–443.
- Karlmak, K.R., Weiskirchen, R., Zimmermann, H.W., Gassler, N., Ginhoux, F., Weber, C., Merad, M., Luedde, T., Trautwein, C., and Tacke, F. (2009). Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1<sup>+</sup> monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* 50, 261–274.
- Kataoka, H., Kono, H., Patel, Z., Kimura, Y., and Rock, K.L. (2014). Evaluation of the contribution of multiple DAMPs and DAMP receptors in cell death-induced sterile inflammatory responses. *PloS One* 9, e104741.
- Kaur, S., Tripathi, D., Dongre, K., Garg, V., Rooge, S., Mukopadhyay, A., Sakhuja, P., and Sarin, S.K. (2012). Increased number and function of endothelial progenitor cells stimulate angiogenesis by resident liver sinusoidal endothelial cells (SECs) in cirrhosis through paracrine factors. *J. Hepatology* 57, 1193–1198.
- Kawada, N., Seki, S., Inoue, M., and Kuroki, T. (1998). Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 27, 1265–1274.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384.
- Kawashima, R., Mochida, S., Matsui, A., YouLuTuZ, Y., Ishikawa, K., Toshima, K., Yamanobe, F., Inao, M., Ikeda, H., Ohno, A., et al. (1999). Expression of osteopontin in Kupffer cells and hepatic macrophages and Stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: a possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 527–531.



- Keegan, A., Martini, R., and Batey, R. (1995). Ethanol-related liver injury in the rat: a model of steatosis, inflammation and pericentral fibrosis. *J. Hepatol.* *23*, 591–600.
- Khan, F., Peltekian, K.M., and Peterson, T.C. (2008). Effect of interferon-alpha, ribavirin, pentoxifylline, and interleukin-18 antibody on hepatitis C sera-stimulated hepatic stellate cell proliferation. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *28*, 643–651.
- Khimji, A., and Rockey, D.C. (2011). Endothelin and hepatic wound healing. *Pharmacol. Res.* *63*, 512–518.
- Khoruts, A., Stahnke, L., McClain, C.J., Logan, G., and Allen, J.I. (1991). Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatol. Baltim. Md* *13*, 267–276.
- Kikuchi, S., Griffin, C.T., Wang, S.-S., and Bissell, D.M. (2005). Role of CD44 in epithelial wound repair: migration of rat hepatic stellate cells utilizes hyaluronic acid and CD44v6. *J. Biol. Chem.* *280*, 15398–15404.
- Kim, H.-Y., Kim, S.-J., and Lee, S.-M. (2015). Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in Kupffer cells in hepatic ischemia/reperfusion. *FEBS J.* *282*, 259–270.
- Kim, J.Y., Kim, K.M., Nan, J.-X., Zhao, Y.Z., Park, P.-H., Lee, S.J., and Sohn, D.H. (2003). Induction of apoptosis by tanshinone I via cytochrome c release in activated hepatic stellate cells. *Pharmacol. Toxicol.* *92*, 195–200.
- Kim, S.U., Park, J.Y., Kim, D.Y., Ahn, S.H., Choi, E.H., Seok, J.Y., Lee, J.M., Park, Y.N., Chon, C.Y., and Han, K.-H. (2010). Non-invasive assessment of changes in liver fibrosis via liver stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B: impact of antiviral treatment on fibrosis regression. *Hepatol. Int.* *4*, 673–680.
- Kim, Y., Ratzliff, V., Choi, S.G., Lalazar, A., Theiss, G., Dang, Q., Kim, S.J., and Friedman, S.L. (1998). Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J. Biol. Chem.* *273*, 33750–33758.
- Kinnman, N., Hulcrantz, R., Barbu, V., Rey, C., Wendum, D., Poupon, R., and Housset, C. (2000). PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *80*, 697–707.
- Kisseleva, T., and Brenner, D.A. (2012). The phenotypic fate and functional role for bone marrow-derived stem cells in liver fibrosis. *J. Hepatol.* *56*, 965–972.
- Kisseleva, T., Uchinami, H., Feirt, N., Quintana-Bustamante, O., Segovia, J.C., Schwabe, R.F., and Brenner, D.A. (2006). Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J. Hepatol.* *45*, 429–438.
- Kisseleva, T., Cong, M., Paik, Y., Scholten, D., Jiang, C., Benner, C., Iwaisako, K., Moore-Morris, T., Scott, B., Tsukamoto, H., et al. (2012). Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 9448–9453.

- Kitamura, Y., Tanigawa, T., Katsumoto, T., Tomita, K., Wang, H.R., Hirai, K., Ichihara, K., and Terada, T. (1997). Cell growth and differentiation of a novel mouse Ito (fat-storing) cell line transformed by a temperature-sensitive mutant of simian virus 40. *Hepatology*. Baltimore, Md 26, 323–329.
- Klein, I., Cornejo, J.C., Polakos, N.K., John, B., Wuensch, S.A., Topham, D.J., Pierce, R.H., and Crispe, I.N. (2007). Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages. *Blood* 110, 4077–4085.
- Knittel, T., Mehde, M., Kobold, D., Saile, B., Dinter, C., and Ramadori, G. (1999). Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J. Hepatology*. 30, 48–60.
- Knolle, P.A., and Gerken, G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol. Rev.* 174, 21–34.
- Kojima, S., Hayashi, S., Shimokado, K., Suzuki, Y., Shimada, J., Crippa, M.P., and Friedman, S.L. (2000). Transcriptional activation of urokinase by the Krüppel-like factor Zf9/COPEB activates latent TGF-beta1 in vascular endothelial cells. *Blood* 95, 1309–1316.
- Koniaris, L.G., McKillop, I.H., Schwartz, S.I., and Zimmers, T.A. (2003). Liver regeneration. *J. Am. Coll. Surg.* 197, 634–659.
- Kono, H., Rusyn, I., Bradford, B.U., Connor, H.D., Mason, R.P., and Thurman, R.G. (2000). Allopurinol prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 296–303.
- Kono, H., Chen, C.-J., Ontiveros, F., and Rock, K.L. (2010). Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 1939–1949.
- Kordes, C., Sawitza, I., and Häussinger, D. (2009). Hepatic and pancreatic stellate cells in focus. *Biol. Chem.* 390, 1003–1012.
- Krause, P., Saghatolislam, F., Koenig, S., Unthan-Fechner, K., and Probst, I. (2009). Maintaining hepatocyte differentiation in vitro through co-culture with hepatic stellate cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 45, 205–212.
- Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee, G., and Choi, S. (2007). Toll-like receptor signal transduction. *Exp. Mol. Med.* 39, 421–438.
- Kubes, P., and Mehal, W.Z. (2012). Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology* 143, 1158–1172.
- Kubota, H., Yao, H., and Reid, L.M. (2007). Identification and characterization of vitamin A-storing cells in fetal liver: implications for functional importance of hepatic stellate cells in liver development and hematopoiesis. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 2339–2349.
- Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2012). The inflammasome: a remote control for metabolic syndrome. *Cell Res.* 22, 1095–1098.

- Larter, C.Z., and Yeh, M.M. (2008). Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 1635–1648.
- Larter, C.Z., Yeh, M.M., Van Rooyen, D.M., Teoh, N.C., Brooling, J., Hou, J.Y., Williams, J., Clyne, M., Nolan, C.J., and Farrell, G.C. (2009). Roles of adipose restriction and metabolic factors in progression of steatosis to steatohepatitis in obese, diabetic mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24, 1658–1668.
- Larter, C.Z., Yeh, M.M., Haigh, W.G., Van Rooyen, D.M., Brooling, J., Heydet, D., Nolan, C.J., Teoh, N.C., and Farrell, G.C. (2013). Dietary modification dampens liver inflammation and fibrosis in obesity-related fatty liver disease. *Obes. Silver Spring Md* 21, 1189–1199.
- Laskin, D.L., and Pendino, K.J. (1995). Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 655–677.
- Lee, U.E., and Friedman, S.L. (2011a). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 25, 195–206.
- Lee, U.E., and Friedman, S.L. (2011b). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 25, 195–206.
- Lee, C.G., Homer, R.J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang, X., Koteliansky, V., Shipley, J.M., Gotwals, P., Noble, P., Chen, Q., et al. (2001). Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J. Exp. Med.* 194, 809–821.
- Lee, G.-S., Subramanian, N., Kim, A.I., Aksentijevich, I., Goldbach-Mansky, R., Sacks, D.B., Germain, R.N., Kastner, D.L., and Chae, J.J. (2012). The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Nature* 492, 123–127.
- Lee, H.-M., Kim, J.-J., Kim, H.J., Shong, M., Ku, B.J., and Jo, E.-K. (2013). Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 62, 194–204.
- Lee, J.M., Dedhar, S., Kalluri, R., and Thompson, E.W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* 172, 973–981.
- Lee, J.S., Semela, D., Iredale, J., and Shah, V.H. (2007). Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? *Hepatol. Baltim. Md* 45, 817–825.
- Leo, M.A., and Lieber, C.S. (1983). Hepatic fibrosis after long-term administration of ethanol and moderate vitamin A supplementation in the rat. *Hepatol. Baltim. Md* 3, 1–11.
- Leroux, A., Ferrere, G., Godie, V., Cailleux, F., Renoud, M.-L., Gaudin, F., Naveau, S., Prévot, S., Makhzami, S., Perlemuter, G., et al. (2012). Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *J. Hepatol.* 57, 141–149.
- Levinsohn, J.L., Newman, Z.L., Hellmich, K.A., Fattah, R., Getz, M.A., Liu, S., Sastalla, I., Leppla, S.H., and Moayeri, M. (2012). Anthrax lethal factor cleavage of Nlrp1 is required for activation of the inflammasome. *PLoS Pathog.* 8, e1002638.

- Li, Y., Luo, Y., Zhang, X., Lin, X., He, M., and Liao, M. (2013). Combined taurine, epigallocatechin gallate and genistein therapy reduces HSC-T6 cell proliferation and modulates the expression of fibrogenic factors. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 20543–20554.
- Liaskou, E., Zimmermann, H.W., Li, K.-K., Oo, Y.H., Suresh, S., Stamataki, Z., Qureshi, O., Lalor, P.F., Shaw, J., Syn, W., et al. (2013). Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. *Hepatology* *57*, 385–398.
- Libbrecht, L., and Roskams, T. (2002). Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* *13*, 389–396.
- Lieber, C.S. (1997). Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *257*, 59–84.
- Lieber, C.S., Jones, D.P., Losowsky, M.S., and Davidson, C.S. (1962). Interrelation of uric acid and ethanol metabolism in man. *J. Clin. Invest.* *41*, 1863–1870.
- Liedtke, C., Luedde, T., Sauerbruch, T., Scholten, D., Streetz, K., Tacke, F., Tolba, R., Trautwein, C., Trebicka, J., and Weiskirchen, R. (2013). Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair* *6*, 19.
- Lim, M.P., Devi, L.A., and Rozenfeld, R. (2011). Cannabidiol causes activated hepatic stellate cell death through a mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cell Death Dis.* *2*, e170.
- Lin, S.L., Castaño, A.P., Nowlin, B.T., Lupher, M.L., and Duffield, J.S. (2009). Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *J. Immunol.* *183*, 6733–6743.
- Lindquist, J.N., Stefanovic, B., and Brenner, D.A. (2000). Regulation of collagen alpha1(I) expression in hepatic stellate cells. *J. Gastroenterol.* *35 Suppl 12*, 80–83.
- Liu, Y.-W., and Huang, Y.-T. (2014). Inhibitory effect of tanshinone IIA on rat hepatic stellate cells. *PLoS One* *9*, e103229.
- Liu, C., Tao, Q., Sun, M., Wu, J.Z., Yang, W., Jian, P., Peng, J., Hu, Y., Liu, C., and Liu, P. (2010). Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *90*, 1805–1816.
- Lopez, M.F., Grahame, N.J., and Becker, H.C. (2011). Development of ethanol withdrawal-related sensitization and relapse drinking in mice selected for high- or low-ethanol preference. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *35*, 953–962.
- Low, T.Y., Leow, C.K., Salto-Tellez, M., and Chung, M.C.M. (2004). A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. *Proteomics* *4*, 3960–3974.
- Lu, B., Nakamura, T., Inouye, K., Li, J., Tang, Y., Lundbäck, P., Valdes-Ferrer, S.I., Olofsson, P.S., Kalb, T., Roth, J., et al. (2012). Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* *488*, 670–674.

- Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Müller, W., Roers, A., and Eming, S.A. (2010). Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 3964–3977.
- Luedde, T., and Schwabe, R.F. (2011). NF- $\kappa$ B in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *8*, 108–118.
- Luna-Casado, L., Diez-Ruiz, A., Gutierrez-Gea, F., Santos-Perez, J.L., Rico-Irles, J., Wachter, H., and Fuchs, D. (1997). Increased peripheral mononuclear cells expression of adhesion molecules in alcoholic cirrhosis: its relation to immune activation. *J. Hepatol.* *27*, 477–483.
- Lurie, Y., Webb, M., Cytter-Kuint, R., Shteingart, S., and Lederkremer, G.Z. (2015). Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* *21*, 11567–11583.
- Macdonald, R.A. (1961). “Lifespan” of liver cells. Autoradio-graphic study using tritiated thymidine in normal, cirrhotic, and partially hepatectomized rats. *Arch. Intern. Med.* *107*, 335–343.
- Maher, J.J., and McGuire, R.F. (1990). Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J. Clin. Invest.* *86*, 1641–1648.
- Mallat, A., and Lotersztajn, S. (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 5. Novel insights into liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *305*, C789–C799.
- Mandrekar, P., and Szabo, G. (2009). Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J. Hepatol.* *50*, 1258–1266.
- Manojlovic, Z., and Stefanovic, B. (2012). A novel role of RNA helicase A in regulation of translation of type I collagen mRNAs. *RNA N. Y. N* *18*, 321–334.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* *23*, 549–555.
- Marakalala, M.J., Vautier, S., Potrykus, J., Walker, L.A., Shepardson, K.M., Hopke, A., Mora-Montes, H.M., Kerrigan, A., Netea, M.G., Murray, G.I., et al. (2013). Differential adaptation of *Candida albicans* in vivo modulates immune recognition by dectin-1. *PLoS Pathog.* *9*, e1003315.
- Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D., French, D.M., Lee, W.P., Roose-Girma, M., Erickson, S., and Dixit, V.M. (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* *430*, 213–218.
- Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O’Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., and Dixit, V.M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* *440*, 228–232.
- Marra, F., Romanelli, R.G., Giannini, C., Failli, P., Pastacaldi, S., Arrighi, M.C., Pinzani, M., Laffi, G., Montalto, P., and Gentilini, P. (1999). Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatol. Baltim. Md* *29*, 140–148.

- Marsden, E.R., Hu, Z., Fujio, K., Nakatsukasa, H., Thorgeirsson, S.S., and Evarts, R.P. (1992). Expression of acidic fibroblast growth factor in regenerating liver and during hepatic differentiation. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *67*, 427–433.
- Martínez-Esparza, M., Tristán-Manzano, M., Ruiz-Alcaraz, A.J., and García-Peñarrubia, P. (2015). Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* *21*, 11522–11541.
- Martinon, F. (2010). Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur. J. Immunol.* *40*, 616–619.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* *10*, 417–426.
- Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* *440*, 237–241.
- Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 229–265.
- Masters, S.L., Dunne, A., Subramanian, S.L., Hull, R.L., Tannahill, G.M., Sharp, F.A., Becker, C., Franchi, L., Yoshihara, E., Chen, Z., et al. (2010). Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 $\beta$  in type 2 diabetes. *Nat. Immunol.* *11*, 897–904.
- Masumoto, J., Taniguchi, S., Nakayama, J., Shiohara, M., Hidaka, E., Katsuyama, T., Murase, S., and Sagara, J. (2001). Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin N-terminal homology domain-containing protein, in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *49*, 1269–1275.
- Matsuoka, M., and Tsukamoto, H. (1990). Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology. Baltim. Md* *11*, 599–605.
- Matsuzaka, T., Atsumi, A., Matsumori, R., Nie, T., Shinozaki, H., Suzuki-Kemuriyama, N., Kuba, M., Nakagawa, Y., Ishii, K., Shimada, M., et al. (2012). Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology. Baltim. Md* *56*, 2199–2208.
- Mauad, T.H., van Nieuwkerk, C.M., Dingemans, K.P., Smit, J.J., Schinkel, A.H., Notenboom, R.G., van den Bergh Weerman, M.A., Verkruisen, R.P., Groen, A.K., and Oude Elferink, R.P. (1994). Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am. J. Pathol.* *145*, 1237–1245.
- McCaffrey, A.P., Nakai, H., Pandey, K., Huang, Z., Salazar, F.H., Xu, H., Wieland, S.F., Marion, P.L., and Kay, M.A. (2003). Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat. Biotechnol.* *21*, 639–644.
- McClain, C.J., Cohen, D.A., Dinarello, C.A., Cannon, J.G., Shedlofsky, S.I., and Kaplan, A.M. (1986). Serum interleukin-1 (IL-1) activity in alcoholic hepatitis. *Life Sci.* *39*, 1479–1485.

- McGill, M.R., Sharpe, M.R., Williams, C.D., Taha, M., Curry, S.C., and Jaeschke, H. (2012). The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *J. Clin. Invest.* *122*, 1574–1583.
- McGill, M.R., Staggs, V.S., Sharpe, M.R., Lee, W.M., Jaeschke, H., and Acute Liver Failure Study Group (2014). Serum mitochondrial biomarkers and damage-associated molecular patterns are higher in acetaminophen overdose patients with poor outcome. *Hepatology*. *Baltimore* *60*, 1336–1345.
- Mehal, W.Z. (2013). The Gordian Knot of dysbiosis, obesity and NAFLD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 637–644.
- Mehal, W.Z. (2014). The inflammasome in liver injury and non-alcoholic fatty liver disease. *Dig. Dis. Basel Switz.* *32*, 507–515.
- Melhem, M.F., Rao, K.N., Kunz, H.W., Kazanecki, M., and Gill, T.J. (1989). Genetic control of susceptibility to diethylnitrosamine carcinogenesis in inbred ACP (grc+) and R16 (grc) rats. *Cancer Res.* *49*, 6813–6821.
- Melón, L.C., Wray, K.N., Moore, E.M., and Boehm, S.L. (2013). Sex and age differences in heavy binge drinking and its effects on alcohol responsiveness following abstinence. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *104*, 177–187.
- Mertens, M., and Singh, J.A. (2009). Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J. Rheumatol.* *36*, 1118–1125.
- de Mesquita, F.C., Bitencourt, S., Caberlon, E., da Silva, G.V., Basso, B.S., Schmid, J., Ferreira, G.A., de Oliveira, F.D.S., and de Oliveira, J.R. (2013). Fructose-1,6-bisphosphate induces phenotypic reversion of activated hepatic stellate cell. *Eur. J. Pharmacol.* *720*, 320–325.
- Messina, J.P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G.S., Pybus, O.G., and Barnes, E. (2015). Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. *Baltimore* *61*, 77–87.
- Metten, P., and Crabbe, J.C. (2005). Alcohol withdrawal severity in inbred mouse (*Mus musculus*) strains. *Behav. Neurosci.* *119*, 911–925.
- Meurer, S.K., Alsamman, M., Sahin, H., Wasmuth, H.E., Kisseleva, T., Brenner, D.A., Trautwein, C., Weiskirchen, R., and Scholten, D. (2013). Overexpression of endoglin modulates TGF- $\beta$ 1-signalling pathways in a novel immortalized mouse hepatic stellate cell line. *PloS One* *8*, e56116.
- Meyer, D.H., Bachem, M.G., and Gressner, A.M. (1990). Modulation of hepatic lipocyte proteoglycan synthesis and proliferation by Kupffer cell-derived transforming growth factors type beta 1 and type alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *171*, 1122–1129.
- Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Grappone, C., Pellegrini, G., Pinzani, M., Casini, A., Calabró, A., Ciancio, G., and Stefanini, F. (1994). Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am. J. Pathol.* *144*, 528–537.

- Mitchell, C., Couton, D., Couty, J.-P., Anson, M., Crain, A.-M., Bizet, V., Rénia, L., Pol, S., Mallet, V., and Gilgenkrantz, H. (2009). Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice. *Am. J. Pathol.* *174*, 1766–1775.
- Miura, K., Nagai, H., Ueno, Y., Goto, T., Mikami, K., Nakane, K., Yoneyama, K., Watanabe, D., Terada, K., Sugiyama, T., et al. (2003). Epimorphin is involved in differentiation of rat hepatic stem-like cells through cell-cell contact. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *311*, 415–423.
- Miura, K., Kodama, Y., Inokuchi, S., Schnabl, B., Aoyama, T., Ohnishi, H., Olefsky, J.M., Brenner, D.A., and Seki, E. (2010). Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology* *139*, 323–334.e7.
- Miura, K., Yang, L., van Rooijen, N., Ohnishi, H., and Seki, E. (2012). Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *302*, G1310–G1321.
- Miyoshi, H., Rust, C., Roberts, P.J., Burgart, L.J., and Gores, G.J. (1999). Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology* *117*, 669–677.
- Mokdad, A.A., Lopez, A.D., Shahrzad, S., Lozano, R., Mokdad, A.H., Stanaway, J., Murray, C.J.L., and Naghavi, M. (2014). Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Med.* *12*, 145.
- Mori, Y., Izawa, T., Takenaka, S., Kuwamura, M., and Yamate, J. (2009). Participation of functionally different macrophage populations and monocyte chemoattractant protein-1 in early stages of thioacetamide-induced rat hepatic injury. *Toxicol. Pathol.* *37*, 463–473.
- Morita, S., and Terada, T. (2014). Molecular mechanisms for biliary phospholipid and drug efflux mediated by ABCB4 and bile salts. *BioMed Res. Int.* *2014*, 954781.
- Morita, S., Tsuda, T., Horikami, M., Teraoka, R., Kitagawa, S., and Terada, T. (2013). Bile salt-stimulated phospholipid efflux mediated by ABCB4 localized in nonraft membranes. *J. Lipid Res.* *54*, 1221–1230.
- Moriwaki, H., Blaner, W.S., Piantedosi, R., and Goodman, D.S. (1988). Effects of dietary retinoid and triglyceride on the lipid composition of rat liver stellate cells and stellate cell lipid droplets. *J. Lipid Res.* *29*, 1523–1534.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 958–969.
- Muhanna, N., Abu Tair, L., Doron, S., Amer, J., Azzeh, M., Mahamid, M., Friedman, S., and Safadi, R. (2011). Amelioration of hepatic fibrosis by NK cell activation. *Gut* *60*, 90–98.
- Mullhaupt, B., Feren, A., Fodor, E., and Jones, A. (1994). Liver expression of epidermal growth factor RNA. Rapid increases in immediate-early phase of liver regeneration. *J. Biol. Chem.* *269*, 19667–19670.
- Murakami, K., Abe, T., Miyazawa, M., Yamaguchi, M., Masuda, T., Matsuura, T., Nagamori, S., Takeuchi, K., Abe, K., and Kyogoku, M. (1995). Establishment of a new human cell line,



LI90, exhibiting characteristics of hepatic Ito (fat-storing) cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *72*, 731–739.

Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 723–737.

Nakae, D., Yoshiji, H., Mizumoto, Y., Horiguchi, K., Shiraiwa, K., Tamura, K., Denda, A., and Konishi, Y. (1992). High incidence of hepatocellular carcinomas induced by a choline deficient L-amino acid defined diet in rats. *Cancer Res.* *52*, 5042–5045.

Nakamoto, Y., Suda, T., Momoi, T., and Kaneko, S. (2004). Different procarcinogenic potentials of lymphocyte subsets in a transgenic mouse model of chronic hepatitis B. *Cancer Res.* *64*, 3326–3333.

Natsume, M., Tsuji, H., Harada, A., Akiyama, M., Yano, T., Ishikura, H., Nakanishi, I., Matsushima, K., Kaneko, S., and Mukaida, N. (1999). Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice. *J. Leukoc. Biol.* *66*, 601–608.

Negash, A.A., Ramos, H.J., Crochet, N., Lau, D.T.Y., Doehle, B., Papic, N., Delker, D.A., Jo, J., Bertoletti, A., Hagedorn, C.H., et al. (2013). IL-1 $\beta$  production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathog.* *9*, e1003330.

Netea, M.G., Nold-Petry, C.A., Nold, M.F., Joosten, L.A.B., Opitz, B., van der Meer, J.H.M., van de Veerdonk, F.L., Ferwerda, G., Heinhuis, B., Devesa, I., et al. (2009). Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 $\beta$  in monocytes and macrophages. *Blood* *113*, 2324–2335.

Neven, B., Prieur, A.-M., and Quartier dit Maire, P. (2008). Cryopyrinopathies: update on pathogenesis and treatment. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* *4*, 481–489.

Nieto, N. (2006). Oxidative-stress and IL-6 mediate the fibrogenic effects of [corrected] Kupffer cells on stellate cells. *Hepatology* *44*, 1487–1501.

Novo, E., Cannito, S., Zamara, E., Valfrè di Bonzo, L., Caligiuri, A., Cravanzola, C., Compagnone, A., Colombatto, S., Marra, F., Pinzani, M., et al. (2007). Proangiogenic cytokines as hypoxia-dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells. *Am. J. Pathol.* *170*, 1942–1953.

Novo, E., Busletta, C., Bonzo, L.V. di, Povero, D., Paternostro, C., Mareschi, K., Ferrero, I., David, E., Bertolani, C., Caligiuri, A., et al. (2011). Intracellular reactive oxygen species are required for directional migration of resident and bone marrow-derived hepatic pro-fibrogenic cells. *J. Hepatology* *54*, 964–974.

Novo, E., Povero, D., Busletta, C., Paternostro, C., di Bonzo, L.V., Cannito, S., Compagnone, A., Bandino, A., Marra, F., Colombatto, S., et al. (2012). The biphasic nature of hypoxia-induced directional migration of activated human hepatic stellate cells. *J. Pathol.* *226*, 588–597.

- Novobrantseva, T.I., Majeau, G.R., Amatucci, A., Kogan, S., Brenner, I., Casola, S., Shlomchik, M.J., Koteliansky, V., Hochman, P.S., and Ibraghimov, A. (2005). Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. *J. Clin. Invest.* *115*, 3072–3082.
- Oh, S.-W., Kim, D.-H., Ha, J.-R., and Kim, D.-Y. (2009). Anti-fibrotic effects of a methylenedioxybenzene compound, CW209292 on dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Biol. Pharm. Bull.* *32*, 1364–1370.
- Ohata, M., Lin, M., Satre, M., and Tsukamoto, H. (1997). Diminished retinoic acid signaling in hepatic stellate cells in cholestatic liver fibrosis. *Am. J. Physiol.* *272*, G589–G596.
- Olaso, E., Salado, C., Egilegor, E., Gutierrez, V., Santisteban, A., Sancho-Bru, P., Friedman, S.L., and Vidal-Vanaclocha, F. (2003). Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. *Hepatology*. *Baltim. Md* *37*, 674–685.
- Olaso, E., Arteta, B., Benedicto, A., Crende, O., and Friedman, S.L. (2011). Loss of discoidin domain receptor 2 promotes hepatic fibrosis after chronic carbon tetrachloride through altered paracrine interactions between hepatic stellate cells and liver-associated macrophages. *Am. J. Pathol.* *179*, 2894–2904.
- Olinga, P., and Schuppan, D. (2013). Precision-cut liver slices: a tool to model the liver ex vivo. *J. Hepatology*. *58*, 1252–1253.
- Olinga, P., Groen, K., Hof, I.H., De Kanter, R., Koster, H.J., Leeman, W.R., Rutten, A.A., Van Twillert, K., and Groothuis, G.M. (1997). Comparison of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* *38*, 59–69.
- Olsen, A.L., Sackey, B.K., Marcinkiewicz, C., Boettiger, D., and Wells, R.G. (2012). Fibronectin extra domain-A promotes hepatic stellate cell motility but not differentiation into myofibroblasts. *Gastroenterology* *142*, 928–937.e3.
- Opal, S.M., Fisher, C.J., Dhainaut, J.F., Vincent, J.L., Brase, R., Lowry, S.F., Sadoff, J.C., Slotman, G.J., Levy, H., Balk, R.A., et al. (1997). Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit. Care Med.* *25*, 1115–1124.
- O’Shea, R.S., Dasarathy, S., McCullough, A.J., Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases, and Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology (2010). Alcoholic liver disease. *Hepatology*. *Baltim. Md* *51*, 307–328.
- Ouyang, X., Ghani, A., and Mehal, W.Z. (2013). Inflammasome biology in fibrogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1832*, 979–988.
- Paik, Y.-H., Schwabe, R.F., Bataller, R., Russo, M.P., Jobin, C., and Brenner, D.A. (2003). Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology*. *Baltim. Md* *37*, 1043–1055.
- Paik, Y.-H., Iwaisako, K., Seki, E., Inokuchi, S., Schnabl, B., Osterreicher, C.H., Kisseleva, T., and Brenner, D.A. (2011). The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase

(NOX) homologues NOX1 and NOX2/gp91(phox) mediate hepatic fibrosis in mice. *Hepatology*. Baltimore, Md 53, 1730–1741.

Palomäki, J., Välimäki, E., Sund, J., Vippola, M., Clausen, P.A., Jensen, K.A., Savolainen, K., Matikainen, S., and Alenius, H. (2011). Long, needle-like carbon nanotubes and asbestos activate the NLRP3 inflammasome through a similar mechanism. *ACS Nano* 5, 6861–6870.

Pan, J.-J., and Fallon, M.B. (2014). Gender and racial differences in nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Hepatology*. 6, 274–283.

Pan, Q., Li, D.-G., Lu, H.-M., Wang, Y.-Q., Zhang, W.-Z., and Xu, Q.-F. (2005). A new immortalized rat cell line, hepatic stellate cell-PQ, exhibiting characteristics of hepatic stellate cell. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. HBPD INT* 4, 281–284.

Park, K.C., Park, J.H., Jeon, J.Y., Kim, S.Y., Kim, J.M., Lim, C.Y., Lee, T.H., Kim, H.K., Lee, H.G., Kim, S.M., et al. (2014). A new histone deacetylase inhibitor improves liver fibrosis in BDL rats through suppression of hepatic stellate cells. *Br. J. Pharmacol.* 171, 4820–4830.

Parola, M., Marra, F., and Pinzani, M. (2008). Myofibroblast - like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Mol. Aspects Med.* 29, 58–66.

Parsons, C.J., Bradford, B.U., Pan, C.Q., Cheung, E., Schauer, M., Knorr, A., Krebs, B., Kraft, S., Zahn, S., Brocks, B., et al. (2004). Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. *Hepatology*. Baltimore, Md 40, 1106–1115.

Parsons, C.J., Stefanovic, B., Seki, E., Aoyama, T., Latour, A.M., Marzluff, W.F., Rippe, R.A., and Brenner, D.A. (2011). Mutation of the 5'-untranslated region stem-loop structure inhibits  $\alpha 1(I)$  collagen expression in vivo. *J. Biol. Chem.* 286, 8609–8619.

Pellicoro, A., Aucott, R.L., Ramachandran, P., Robson, A.J., Fallowfield, J.A., Snowdon, V.K., Hartland, S.N., Vernon, M., Duffield, J.S., Benyon, R.C., et al. (2012). Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. *Hepatology*. Baltimore, Md 55, 1965–1975.

Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J.P., and Fallowfield, J.A. (2014). Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 181–194.

Peng, Y., French, B.A., Tillman, B., Morgan, T.R., and French, S.W. (2014). The inflammasome in alcoholic hepatitis: Its relationship with Mallory-Denk body formation. *Exp. Mol. Pathol.* 97, 305–313.

Petrasek, J., Dolganiuc, A., Csak, T., Kurt-Jones, E.A., and Szabo, G. (2011). Type I interferons protect from Toll-like receptor 9-associated liver injury and regulate IL-1 receptor antagonist in mice. *Gastroenterology* 140, 697–708.e4.

Petrasek, J., Bala, S., Csak, T., Lippai, D., Kodys, K., Menashy, V., Barrieau, M., Min, S.-Y., Kurt-Jones, E.A., and Szabo, G. (2012). IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 3476–3489.

- Petrasek, J., Csak, T., Ganz, M., and Szabo, G. (2013). Differences in innate immune signaling between alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *28 Suppl 1*, 93–98.
- Petrasek, J., Iracheta-Vellve, A., Saha, B., Satishchandran, A., Kodys, K., Fitzgerald, K.A., Kurt-Jones, E.A., and Szabo, G. (2015). Metabolic danger signals, uric acid and ATP, mediate inflammatory cross-talk between hepatocytes and immune cells in alcoholic liver disease. *J. Leukoc. Biol.* *98*, 249–256.
- Piccini, A., Carta, S., Tassi, S., Lasiglié, D., Fossati, G., and Rubartelli, A. (2008). ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 8067–8072.
- Pinheiro-Margis, M., Margis, R., and Borojevic, R. (1992). Collagen synthesis in an established liver connective tissue cell line (GRX) during induction of the fat-storing phenotype. *Exp. Mol. Pathol.* *56*, 108–118.
- Pinzani, M. (2002). PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *7*, d1720–d1726.
- Pinzani, M., and Marra, F. (2001). Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* *21*, 397–416.
- Pinzani, M., Milani, S., De Franco, R., Grappone, C., Caligiuri, A., Gentilini, A., Tosti-Guerra, C., Maggi, M., Failli, P., Ruocco, C., et al. (1996). Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* *110*, 534–548.
- Plato, A., Willment, J.A., and Brown, G.D. (2013). C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. *Int. Rev. Immunol.* *32*, 134–156.
- Ploeger, D.T., Hosper, N.A., Schipper, M., Koerts, J.A., de Rond, S., and Bank, R.A. (2013). Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell Commun. Signal. CCS* *11*, 29.
- Ploeger, D.T.A., van Putten, S.M., Koerts, J.A., van Luyn, M.J.A., and Harmsen, M.C. (2012). Human macrophages primed with angiogenic factors show dynamic plasticity, irrespective of extracellular matrix components. *Immunobiology* *217*, 299–306.
- Poeck, H., and Ruland, J. (2012). From virus to inflammation: mechanisms of RIG-I-induced IL-1 $\beta$  production. *Eur. J. Cell Biol.* *91*, 59–64.
- Popov, Y., Patsenker, E., Fickert, P., Trauner, M., and Schuppan, D. (2005). Mdr2 (Abcb4)-/- mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *J. Hepatol.* *43*, 1045–1054.
- Popov, Y., Patsenker, E., Stickel, F., Zaks, J., Bhaskar, K.R., Niedobitek, G., Kolb, A., Friess, H., and Schuppan, D. (2008). Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6 is a marker of the progression of biliary and portal liver fibrosis and a novel target for antifibrotic therapies. *J. Hepatol.* *48*, 453–464.

- Poynard, T., Ratziu, V., Benhamou, Y., Opolon, P., Cacoub, P., and Bedossa, P. (2000a). Natural history of HCV infection. *Baillière's Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *14*, 211–228.
- Poynard, T., Ratziu, V., Benmanov, Y., Di Martino, V., Bedossa, P., and Opolon, P. (2000b). Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin. Liver Dis.* *20*, 47–55.
- Poynard, T., Yuen, M.-F., Ratziu, V., and Lai, C.L. (2003). Viral hepatitis C. *Lancet Lond. Engl.* *362*, 2095–2100.
- Poynard, T., Massard, J., Rudler, M., Varaud, A., Lebray, P., Moussalli, J., Munteanu, M., Ngo, Y., Thabut, D., Benhamou, Y., et al. (2009). Impact of interferon-alpha treatment on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B: an overview of published trials. *Gastroentérologie Clin. Biol.* *33*, 916–922.
- Poynard, T., Lebray, P., Ingiliz, P., Varaut, A., Varsat, B., Ngo, Y., Norha, P., Munteanu, M., Drane, F., Messous, D., et al. (2010). Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest). *BMC Gastroenterol.* *10*, 40.
- Pradere, J.-P., Kluwe, J., De Minicis, S., Jiao, J.-J., Gwak, G.-Y., Dapito, D.H., Jang, M.-K., Guenther, N.D., Mederacke, I., Friedman, R., et al. (2013). Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology. Baltim. Md* *58*, 1461–1473.
- Proell, V., Mikula, M., Fuchs, E., and Mikulits, W. (2005). The plasticity of p19 ARF null hepatic stellate cells and the dynamics of activation. *Biochim. Biophys. Acta* *1744*, 76–87.
- Puche, J.E., Saiman, Y., and Friedman, S.L. (2013). Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr. Physiol.* *3*, 1473–1492.
- Qin, L., and Han, Y.-P. (2010). Epigenetic repression of matrix metalloproteinases in myofibroblastic hepatic stellate cells through histone deacetylases 4: implication in tissue fibrosis. *Am. J. Pathol.* *177*, 1915–1928.
- Racine-Samson, L., Rockey, D.C., and Bissell, D.M. (1997). The role of alpha1beta1 integrin in wound contraction. A quantitative analysis of liver myofibroblasts in vivo and in primary culture. *J. Biol. Chem.* *272*, 30911–30917.
- Radbill, B.D., Gupta, R., Ramirez, M.C.M., DiFeo, A., Martignetti, J.A., Alvarez, C.E., Friedman, S.L., Narla, G., Vrabie, R., Bowles, R., et al. (2011). Loss of matrix metalloproteinase-2 amplifies murine toxin-induced liver fibrosis by upregulating collagen I expression. *Dig. Dis. Sci.* *56*, 406–416.
- Ramachandran, P., and Iredale, J.P. (2012). Macrophages: central regulators of hepatic fibrogenesis and fibrosis resolution. *J. Hepatology.* *56*, 1417–1419.
- Ramachandran, P., Pellicoro, A., Vernon, M.A., Boulter, L., Aucott, R.L., Ali, A., Hartland, S.N., Snowdon, V.K., Cappon, A., Gordon-Walker, T.T., et al. (2012). Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E3186–E3195.

- Ramadori, G., Rieder, H., Theiss, F., and Meyer zum Büschenfelde, K.H. (1989). Fat-storing (Ito) cells of rat liver synthesize and secrete apolipoproteins: comparison with hepatocytes. *Gastroenterology* *97*, 163–172.
- Ramadori, G., Neubauer, K., Odenthal, M., Nakamura, T., Knittel, T., Schwögl, S., and Meyer zum Büschenfelde, K.H. (1992). The gene of hepatocyte growth factor is expressed in fat-storing cells of rat liver and is downregulated during cell growth and by transforming growth factor-beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *183*, 739–742.
- Ramadori, P., Weiskirchen, R., Trebicka, J., and Streetz, K. (2015). Mouse models of metabolic liver injury. *Lab. Anim.* *49*, 47–58.
- Ramani, K., and Tomasi, M.L. (2012). Transcriptional regulation of methionine adenosyltransferase 2A by peroxisome proliferator-activated receptors in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* *55*, 1942–1953.
- Rambaldi, A., and Gluud, C. (2001). Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis or cirrhosis. *Liver* *21*, 129–136.
- Ratanasavanh, D., Beaune, P., Morel, F., Flinois, J.P., Guengerich, F.P., and Guillouzo, A. (1991). Intralobular distribution and quantitation of cytochrome P-450 enzymes in human liver as a function of age. *Hepatology* *13*, 1142–1151.
- Rathinam, V.A.K., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., et al. (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat. Immunol.* *11*, 395–402.
- Rawat, R., Cohen, T.V., Ampong, B., Francia, D., Henriques-Pons, A., Hoffman, E.P., and Nagaraju, K. (2010). Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle. *Am. J. Pathol.* *176*, 2891–2900.
- Regev, A., Berho, M., Jeffers, L.J., Milikowski, C., Molina, E.G., Pyllosopoulos, N.T., Feng, Z.-Z., Reddy, K.R., and Schiff, E.R. (2002). Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am. J. Gastroenterol.* *97*, 2614–2618.
- Reynaert, H., Thompson, M.G., Thomas, T., and Geerts, A. (2002). Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* *50*, 571–581.
- Rietdijk, S.T., Burwell, T., Bertin, J., and Coyle, A.J. (2008). Sensing intracellular pathogens-NOD-like receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* *8*, 261–266.
- Rinella, M.E., and Green, R.M. (2004). The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J. Hepatology* *40*, 47–51.
- Rivera, C.A., Bradford, B.U., Hunt, K.J., Adachi, Y., Schrum, L.W., Koop, D.R., Burchardt, E.R., Rippe, R.A., and Thurman, R.G. (2001a). Attenuation of CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis by GdCl<sub>3</sub> treatment or dietary glycine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *281*, G200–G207.
- Rivera, C.A., Bradford, B.U., Hunt, K.J., Adachi, Y., Schrum, L.W., Koop, D.R., Burchardt, E.R., Rippe, R.A., and Thurman, R.G. (2001b). Attenuation of CCl<sub>4</sub>-induced hepatic

fibrosis by GdCl<sub>3</sub> treatment or dietary glycine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *281*, G200–G207.

Rivera, C.A., Adegboyega, P., van Rooijen, N., Tagalicud, A., Allman, M., and Wallace, M. (2007). Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* *47*, 571–579.

Robbins, C.S., Hilgendorf, I., Weber, G.F., Theurl, I., Iwamoto, Y., Figueiredo, J.-L., Gorbatov, R., Sukhova, G.K., Gerhardt, L.M.S., Smyth, D., et al. (2013). Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat. Med.* *19*, 1166–1172.

Robert, S., Gicquel, T., Bodin, A., Lagente, V., and Boichot, E. (2016). Characterization of the MMP/TIMP Imbalance and Collagen Production Induced by IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  Release from Human Hepatic Stellate Cells. *PloS One* *11*, e0153118.

Rockey, D.C. (2001). Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin. Liver Dis.* *21*, 337–349.

Rockey, D.C. (2003). Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology* *37*, 4–12.

Rockey, D.C., and Bissell, D.M. (2006). Noninvasive measures of liver fibrosis. *Hepatology* *43*, S113–S120.

Rockey, D.C., Fouassier, L., Chung, J.J., Carayon, A., Vallee, P., Rey, C., and Housset, C. (1998). Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells. *Hepatology* *27*, 472–480.

Roderfeld, M., Geier, A., Dietrich, C.G., Siewert, E., Jansen, B., Gartung, C., and Roeb, E. (2006a). Cytokine blockade inhibits hepatic tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression and up-regulates matrix metalloproteinase-9 in toxic liver injury. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* *26*, 579–586.

Roderfeld, M., Weiskirchen, R., Wagner, S., Berres, M.-L., Henkel, C., Grötzinger, J., Gressner, A.M., Matern, S., and Roeb, E. (2006b). Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 444–454.

Rodríguez-Garay, E.A., Agüero, R.M., Pisani, G., Trbojevich, R.A., Farroni, A., and Viglianco, R.A. (1996). Rat model of mild stenosis of the common bile duct. *Res. Exp. Med. Z. Für Gesamte Exp. Med. Einschl. Exp. Chir.* *196*, 105–116.

Rojkind, M., Giambrone, M.A., and Biempica, L. (1979). Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* *76*, 710–719.

Rosenbaum, J., Blazejewski, S., Préaux, A.M., Mallat, A., Dhumeaux, D., and Mavier, P. (1995). Fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor beta 1 interactions in human liver myofibroblasts. *Gastroenterology* *109*, 1986–1996.

Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M., and Sitia, R. (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* *9*, 1503–1510.

- Russo, F.P., Alison, M.R., Bigger, B.W., Amofah, E., Florou, A., Amin, F., Bou-Gharios, G., Jeffery, R., Iredale, J.P., and Forbes, S.J. (2006). The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 130, 1807–1821.
- Sahin, H., Trautwein, C., and Wasmuth, H.E. (2010). Functional role of chemokines in liver disease models. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 682–690.
- Saile, B., Eisenbach, C., Dudas, J., El-Armouche, H., and Ramadori, G. (2004a). Interferon-gamma acts proapoptotic on hepatic stellate cells (HSC) and abrogates the antiapoptotic effect of interferon-alpha by an HSP70-dependant pathway. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 469–476.
- Saile, B., DiRocco, P., Dudas, J., El-Armouche, H., Sebb, H., Eisenbach, C., Neubauer, K., and Ramadori, G. (2004b). IGF-I induces DNA synthesis and apoptosis in rat liver hepatic stellate cells (HSC) but DNA synthesis and proliferation in rat liver myofibroblasts (rMF). *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 84, 1037–1049.
- Sakamoto, T., Higaki, Y., Hara, M., Ichiba, M., Horita, M., Mizuta, T., Eguchi, Y., Yasutake, T., Ozaki, I., Yamamoto, K., et al. (2008). Interaction between interleukin-1beta -31T/C gene polymorphism and drinking and smoking habits on the risk of hepatocellular carcinoma among Japanese. *Cancer Lett.* 271, 98–104.
- Salguero Palacios, R., Roderfeld, M., Hemmann, S., Rath, T., Atanasova, S., Tschuschner, A., Gressner, O.A., Weiskirchen, R., Graf, J., and Roeb, E. (2008). Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 88, 1192–1203.
- Sánchez-Pérez, Y., Carrasco-Legleu, C., García-Cuellar, C., Pérez-Carreón, J., Hernández-García, S., Salcido-Neyoy, M., Alemán-Lazarini, L., and Villa-Treviño, S. (2005). Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* 217, 25–32.
- Sander, L.E., and Blander, J.M. (2009). Inflammasome and toll-like receptor 9: Partners in crime in toxic liver injury. *Hepatology* 49, 2119–2121.
- Sanyal, A.J., Chalasani, N., Kowdley, K.V., McCullough, A., Diehl, A.M., Bass, N.M., Neuschwander-Tetri, B.A., Lavine, J.E., Tonascia, J., Unalp, A., et al. (2010). Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* 362, 1675–1685.
- Sato, A., Nakashima, H., Nakashima, M., Ikarashi, M., Nishiyama, K., Kinoshita, M., and Seki, S. (2014). Involvement of the TNF and FasL produced by CD11b Kupffer cells/macrophages in CCl4-induced acute hepatic injury. *PloS One* 9, e92515.
- Sauvant, P., Abergel, A., Partier, A., Alexandre-Gouabau, M.-C., Rock, E., Sion, B., Motta, C., Sapin, V., and Azaïs-Bresco, V. (2002a). Treatment of the rat hepatic stellate cell line, PAV-1, by retinol and palmitic acid leads to a convenient model to study retinoids metabolism. *Biol. Cell* 94, 401–408.
- Sauvant, P., Sapin, V., Abergel, A., Schmidt, C.K., Blanchon, L., Alexandre-Gouabau, M.C., Rosenbaum, J., Bommelaer, G., Rock, E., Dastugue, B., et al. (2002b). PAV-1, a new rat hepatic stellate cell line converts retinol into retinoic acid, a process altered by ethanol. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1017–1029.



- Sawitzka, I., Kordes, C., Reister, S., and Häussinger, D. (2009). The niche of stellate cells within rat liver. *Hepatology*. Baltimore, Md *50*, 1617–1624.
- Scaglione, S., Kliethermes, S., Cao, G., Shoham, D., Durazo, R., Luke, A., and Volk, M.L. (2015). The Epidemiology of Cirrhosis in the United States: A Population-based Study. *J. Clin. Gastroenterol.* *49*, 690–696.
- Schirmacher, P., Geerts, A., Jung, W., Pietrangelo, A., Rogler, C.E., and Dienes, H.P. (1993). The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver. *EXS* *65*, 285–299.
- Schnabl, B., Choi, Y.H., Olsen, J.C., Hagedorn, C.H., and Brenner, D.A. (2002). Immortal activated human hepatic stellate cells generated by ectopic telomerase expression. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *82*, 323–333.
- Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C., and Weiskirchen, R. (2015). The carbon tetrachloride model in mice. *Lab. Anim.* *49*, 4–11.
- Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell* *140*, 821–832.
- Schuppan, D. (1990). Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin. Liver Dis.* *10*, 1–10.
- Schuppan, D., and Afdhal, N.H. (2008). Liver cirrhosis. *Lancet Lond. Engl.* *371*, 838–851.
- Schuppan, D., and Kim, Y.O. (2013). Evolving therapies for liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* *123*, 1887–1901.
- Schvarcz, R., Johansson, B., Nyström, B., and Sönnernborg, A. (1997). Nosocomial transmission of hepatitis C virus. *Infection* *25*, 74–77.
- Schwabe, R.F., Bataller, R., and Brenner, D.A. (2003). Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *285*, G949–G958.
- Seglen, P.O. (1997). DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival. *Cell Biol. Toxicol.* *13*, 301–315.
- Seki, E., and Schnabl, B. (2012). Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *J. Physiol.* *590*, 447–458.
- Seki, E., and Schwabe, R.F. (2015). Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology*. Baltimore, Md *61*, 1066–1079.
- Seki, E., Tsutsui, H., Nakano, H., Tsuji, N., Hoshino, K., Adachi, O., Adachi, K., Futatsugi, S., Kuida, K., Takeuchi, O., et al. (2001). Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta. *J. Immunol. Baltimore, Md* *166*, 2651–2657.
- Seki, E., De Minicis, S., Osterreicher, C.H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D.A., and Schwabe, R.F. (2007). TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat. Med.* *13*, 1324–1332.

- Seki, E., De Minicis, S., Gwak, G.-Y., Kluwe, J., Inokuchi, S., Bursill, C.A., Llovet, J.M., Brenner, D.A., and Schwabe, R.F. (2009a). CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 1858–1870.
- Seki, E., de Minicis, S., Inokuchi, S., Taura, K., Miyai, K., van Rooijen, N., Schwabe, R.F., and Brenner, D.A. (2009b). CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatology*. *Baltim. Md* *50*, 185–197.
- Sell, S. (2001). Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology*. *Baltim. Md* *33*, 738–750.
- Serti, E., Werner, J.M., Chattergoon, M., Cox, A.L., Lohmann, V., and Rehmann, B. (2014). Monocytes activate natural killer cells via inflammasome-induced interleukin 18 in response to hepatitis C virus replication. *Gastroenterology* *147*, 209–220.e3.
- Shafiei, M.S., and Rockey, D.C. (2012). The function of integrin-linked kinase in normal and activated stellate cells: implications for fibrogenesis in wound healing. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *92*, 305–316.
- Shao, R., Yan, W., and Rockey, D.C. (1999). Regulation of endothelin-1 synthesis by endothelin-converting enzyme-1 during wound healing. *J. Biol. Chem.* *274*, 3228–3234.
- Shi, Z., Wakil, A.E., and Rockey, D.C. (1997). Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 10663–10668.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Akao, Y., Kosaka, H., Hasegawa, J., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1996). Involvement of ICE family proteases in apoptosis induced by reoxygenation of hypoxic hepatocytes. *Am. J. Physiol.* *271*, G949–G958.
- Shinohara, M., Ji, C., and Kaplowitz, N. (2010). Differences in betaine-homocysteine methyltransferase expression, endoplasmic reticulum stress response, and liver injury between alcohol-fed mice and rats. *Hepatology*. *Baltim. Md* *51*, 796–805.
- Shiratori, Y., Geerts, A., Ichida, T., Kawase, T., and Wisse, E. (1986). Kupffer cells from CCl<sub>4</sub>-induced fibrotic livers stimulate proliferation of fat-storing cells. *J. Hepatology*. *3*, 294–303.
- Shito, M., Wakabayashi, G., Ueda, M., Shimazu, M., Shirasugi, N., Endo, M., Mukai, M., and Kitajima, M. (1997). Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* *63*, 143–148.
- Shulga, N., and Pastorino, J.G. (2014). Hexokinase II binding to mitochondria is necessary for Kupffer cell activation and is potentiated by ethanol exposure. *J. Biol. Chem.* *289*, 26213–26225.
- Sitia, G., Aiolfi, R., Di Lucia, P., Mainetti, M., Fiocchi, A., Mingozzi, F., Esposito, A., Ruggeri, Z.M., Chisari, F.V., Iannaccone, M., et al. (2012). Antiplatelet therapy prevents hepatocellular carcinoma and improves survival in a mouse model of chronic hepatitis B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E2165–E2172.

- Smedsrød, B., Le Couteur, D., Ikejima, K., Jaeschke, H., Kawada, N., Naito, M., Knolle, P., Nagy, L., Senoo, H., Vidal-Vanaclocha, F., et al. (2009). Hepatic sinusoidal cells in health and disease: update from the 14th International Symposium. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 29, 490–501.
- Sohail, M.A., Hashmi, A.Z., Hakim, W., Watanabe, A., Zipprich, A., Groszmann, R.J., Dranoff, J.A., Torok, N.J., and Mehal, W.Z. (2009). Adenosine induces loss of actin stress fibers and inhibits contraction in hepatic stellate cells via Rho inhibition. *Hepatology* 49, 185–194.
- Song, E., Ouyang, N., Hörbelt, M., Antus, B., Wang, M., and Exton, M.S. (2000). Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell. Immunol.* 204, 19–28.
- Sørensen, K.K., McCourt, P., Berg, T., Crossley, C., Le Couteur, D., Wake, K., and Smedsrød, B. (2012). The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 303, R1217–R1230.
- Sprenger, H., Kaufmann, A., Garn, H., Lahme, B., Gemsa, D., and Gressner, A.M. (1999). Differential expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in transforming rat hepatic stellate cells. *J. Hepatology* 30, 88–94.
- Standish, R.A., Cholongitas, E., Dhillon, A., Burroughs, A.K., and Dhillon, A.P. (2006). An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut* 55, 569–578.
- Starkel, P., and Leclercq, I.A. (2011). Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 25, 319–333.
- Stärkel, P., Sempoux, C., Leclercq, I., Herin, M., Deby, C., Desager, J.-P., and Horsmans, Y. (2003). Oxidative stress, KLF6 and transforming growth factor-beta up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats. *J. Hepatology* 39, 538–546.
- Stefano, J.T., Cogliati, B., Santos, F., Lima, V.M.R., Mazo, D.C., Matte, U., Alvares-da-Silva, M.R., Silveira, T.R., Carrilho, F.J., and Oliveira, C.P.M.S. (2011). S-Nitroso-N-acetylcysteine induces de-differentiation of activated hepatic stellate cells and promotes antifibrotic effects in vitro. *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* 25, 360–365.
- Stefanovic, B., Hellerbrand, C., Holcik, M., Briendl, M., Aliebhauer, S., and Brenner, D.A. (1997). Posttranscriptional regulation of collagen alpha1(I) mRNA in hepatic stellate cells. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5201–5209.
- Stefanovic, B., Hellerbrand, C., and Brenner, D.A. (1999). Regulatory role of the conserved stem-loop structure at the 5' end of collagen alpha1(I) mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4334–4342.
- Stefanovic, L., Brenner, D.A., and Stefanovic, B. (2005). Direct hepatotoxic effect of KC chemokine in the liver without infiltration of neutrophils. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 230, 573–586.

- Steiling, H., Mühlbauer, M., Bataille, F., Schölmerich, J., Werner, S., and Hellerbrand, C. (2004). Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. *Am. J. Pathol.* *165*, 1233–1241.
- Stewart, R.K., Dangi, A., Huang, C., Murase, N., Kimura, S., Stolz, D.B., Wilson, G.C., Lentsch, A.B., and Gandhi, C.R. (2014). A novel mouse model of depletion of stellate cells clarifies their role in ischemia/reperfusion- and endotoxin-induced acute liver injury. *J. Hepatol.* *60*, 298–305.
- Stibůrková, B., Pavlíková, M., Sokolová, J., and Kožich, V. (2014). Metabolic syndrome, alcohol consumption and genetic factors are associated with serum uric acid concentration. *PLoS One* *9*, e97646.
- Stout, R.D., and Suttles, J. (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.* *76*, 509–513.
- Stout, R.D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S.K., and Suttles, J. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 342–349.
- Su, Y.-H., Shu, K.-H., Hu, C., Cheng, C.-H., Wu, M.-J., Yu, T.-M., Chuang, Y.-W., Huang, S.-T., and Chen, C.-H. (2012). Hepatic stellate cells attenuate the immune response in renal transplant recipients with chronic hepatitis. *Transplant. Proc.* *44*, 725–729.
- Sunami, Y., Leithäuser, F., Gul, S., Fiedler, K., Güldiken, N., Espenlaub, S., Holzmann, K.-H., Hipp, N., Sindrilariu, A., Luedde, T., et al. (2012). Hepatic activation of IKK/NFκB signaling induces liver fibrosis via macrophage-mediated chronic inflammation. *Hepatol. Baltim. Md* *56*, 1117–1128.
- Sung, C.K., She, H., Xiong, S., and Tsukamoto, H. (2004). Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity at a posttranslational level in hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *286*, G722–G729.
- Sutterwala, F.S., Mijares, L.A., Li, L., Ogura, Y., Kazmierczak, B.I., and Flavell, R.A. (2007). Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J. Exp. Med.* *204*, 3235–3245.
- Suzuki, T., Franchi, L., Toma, C., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Inohara, N., Sasakawa, C., and Nuñez, G. (2007). Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via IpaB and ASC in *Shigella*-infected macrophages. *PLoS Pathog.* *3*, e111.
- Szabo, G. (2015). Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* *148*, 30–36.
- Szabo, G., and Csak, T. (2012). Inflammasomes in liver diseases. *J. Hepatol.* *57*, 642–654.
- Szabo, G., and Petrasek, J. (2015a). Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 387–400.
- Szabo, G., and Petrasek, J. (2015b). Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 387–400.

- Szabo, G., Mandrekar, P., and Dolganiuc, A. (2007). Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin. Liver Dis.* 27, 339–350.
- Tacke, F., and Weiskirchen, R. (2012). Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 6, 67–80.
- Tacke, F., and Zimmermann, H.W. (2014). Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J. Hepatol.* 60, 1090–1096.
- Takenouchi, T., Yoshioka, M., Yamanaka, N., and Kitani, H. (2010). Reversible conversion of epithelial and mesenchymal phenotypes in SV40 large T antigen-immortalized rat liver cell lines. *Cell Biol. Int. Rep.* 17, e00001.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Takeuchi, D., Yoshidome, H., Kato, A., Ito, H., Kimura, F., Shimizu, H., Ohtsuka, M., Morita, Y., and Miyazaki, M. (2004). Interleukin 18 causes hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing anti-inflammatory cytokine expression in mice. *Hepatol. Baltim. Md* 39, 699–710.
- Tarrats, N., Moles, A., Morales, A., García-Ruiz, C., Fernández-Checa, J.C., and Marí, M. (2011). Critical role of tumor necrosis factor receptor 1, but not 2, in hepatic stellate cell proliferation, extracellular matrix remodeling, and liver fibrogenesis. *Hepatol. Baltim. Md* 54, 319–327.
- Taura, K., De Minicis, S., Seki, E., Hatano, E., Iwaisako, K., Osterreicher, C.H., Kodama, Y., Miura, K., Ikai, I., Uemoto, S., et al. (2008). Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis. *Gastroenterology* 135, 1729–1738.
- Thabut, D., Routray, C., Lomberk, G., Shergill, U., Glaser, K., Huebert, R., Patel, L., Masyuk, T., Blechacz, B., Vercnocke, A., et al. (2011). Complementary vascular and matrix regulatory pathways underlie the beneficial mechanism of action of sorafenib in liver fibrosis. *Hepatol. Baltim. Md* 54, 573–585.
- Thein, H.-H., Yi, Q., Dore, G.J., and Krahn, M.D. (2008). Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatol. Baltim. Md* 48, 418–431.
- Thomas, J.A., Pope, C., Wojtacha, D., Robson, A.J., Gordon-Walker, T.T., Hartland, S., Ramachandran, P., Van Deemter, M., Hume, D.A., Iredale, J.P., et al. (2011). Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function. *Hepatol. Baltim. Md* 53, 2003–2015.
- Thomas, R.J., Bhandari, R., Barrett, D.A., Bennett, A.J., Fry, J.R., Powe, D., Thomson, B.J., and Shakesheff, K.M. (2005). The effect of three-dimensional co-culture of hepatocytes and hepatic stellate cells on key hepatocyte functions in vitro. *Cells Tissues Organs* 181, 67–79.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., and Aunins, J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768–774.

- Thrall, K.D., Vucelick, M.E., Gies, R.A., Zangar, R.C., Weitz, K.K., Poet, T.S., Springer, D.L., Grant, D.M., and Benson, J.M. (2000). Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. *J. Toxicol. Environ. Health A* 60, 531–548.
- Tilg, H., Wilmer, A., Vogel, W., Herold, M., Nölchen, B., Judmaier, G., and Huber, C. (1992). Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 103, 264–274.
- Tilg, H., Jalan, R., Kaser, A., Davies, N.A., Offner, F.A., Hodges, S.J., Ludwiczek, O., Shawcross, D., Zoller, H., Alisa, A., et al. (2003). Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.* 38, 419–425.
- Tiwari, R.L., Singh, V., Singh, A., and Barthwal, M.K. (2011). IL-1R-associated kinase-1 mediates protein kinase C $\delta$ -induced IL-1 $\beta$  production in monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 2632–2645.
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349–363.
- Tomita, K., Tamiya, G., Ando, S., Ohsumi, K., Chiyo, T., Mizutani, A., Kitamura, N., Toda, K., Kaneko, T., Horie, Y., et al. (2006). Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut* 55, 415–424.
- Tosello-Trampont, A.-C., Landes, S.G., Nguyen, V., Novobrantseva, T.I., and Hahn, Y.S. (2012). Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *J. Biol. Chem.* 287, 40161–40172.
- Troeger, J.S., Mederacke, I., Gwak, G.-Y., Dapito, D.H., Mu, X., Hsu, C.C., Pradere, J.-P., Friedman, R.A., and Schwabe, R.F. (2012). Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology* 143, 1073–1083.e22.
- Tsujimura, K., Ichinose, F., Hara, T., Yamasaki, K., Otsuka, M., and Fukushima, S. (2008). The inhalation exposure of carbon tetrachloride promote rat liver carcinogenesis in a medium-term liver bioassay. *Toxicol. Lett.* 176, 207–214.
- Tsukamoto, H., Reidelberger, R.D., French, S.W., and Largman, C. (1984). Long-term cannulation model for blood sampling and intragastric infusion in the rat. *Am. J. Physiol.* 247, R595–R599.
- Tsukamoto, H., Zhu, N.-L., Wang, J., Asahina, K., and Machida, K. (2012). Morphogens and hepatic stellate cell fate regulation in chronic liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 27 Suppl 2, 94–98.
- Urtasun, R., Lopategi, A., George, J., Leung, T.-M., Lu, Y., Wang, X., Ge, X., Fiel, M.I., and Nieto, N. (2012). Osteopontin, an oxidant stress sensitive cytokine, up-regulates collagen-I via integrin  $\alpha$ (V) $\beta$ (3) engagement and PI3K/pAkt/NF $\kappa$ B signaling. *Hepatol. Baltim. Md* 55, 594–608.

- Vandanmagsar, B., Youm, Y.-H., Ravussin, A., Galgani, J.E., Stadler, K., Mynatt, R.L., Ravussin, E., Stephens, J.M., and Dixit, V.D. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* *17*, 179–188.
- Van Rooyen, D.M., Larter, C.Z., Haigh, W.G., Yeh, M.M., Ioannou, G., Kuver, R., Lee, S.P., Teoh, N.C., and Farrell, G.C. (2011). Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* *141*, 1393–1403, 1403.e1–e5.
- Verna, L., Whysner, J., and Williams, G.M. (1996). N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol. Ther.* *71*, 57–81.
- Vladimer, G.I., Weng, D., Paquette, S.W.M., Vanaja, S.K., Rathinam, V.A.K., Aune, M.H., Conlon, J.E., Burbage, J.J., Proulx, M.K., Liu, Q., et al. (2012). The NLRP12 inflammasome recognizes *Yersinia pestis*. *Immunity* *37*, 96–107.
- Vogel, S., Piantedosi, R., Frank, J., Lalazar, A., Rockey, D.C., Friedman, S.L., and Blaner, W.S. (2000). An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro. *J. Lipid Res.* *41*, 882–893.
- Vyas, S.K., Leyland, H., Gentry, J., and Arthur, M.J. (1995). Rat hepatic lipocytes synthesize and secrete transin (stromelysin) in early primary culture. *Gastroenterology* *109*, 889–898.
- Wake, K. (1971). “Sternzellen” in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am. J. Anat.* *132*, 429–462.
- Walker, R.M. (1966). Francis Glisson and his capsule. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* *38*, 71–91.
- Walkin, L., Herrick, S.E., Summers, A., Brenchley, P.E., Hoff, C.M., Korstanje, R., and Margetts, P.J. (2013). The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review. *Fibrogenesis Tissue Repair* *6*, 18.
- Wallace, M.C., Hamesch, K., Lunova, M., Kim, Y., Weiskirchen, R., Strnad, P., and Friedman, S.L. (2015). Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats. *Lab. Anim.* *49*, 21–29.
- Wang, J., Leclercq, I., Brymora, J.M., Xu, N., Ramezani-Moghadam, M., London, R.M., Brigstock, D., and George, J. (2009). Kupffer cells mediate leptin-induced liver fibrosis. *Gastroenterology* *137*, 713–723.
- Wang, L., Wang, X., Wang, L., Chiu, J.D., van de Ven, G., Gaarde, W.A., and Deleve, L.D. (2012a). Hepatic vascular endothelial growth factor regulates recruitment of rat liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells. *Gastroenterology* *143*, 1555–1563.e2.
- Wang, L., Wang, X., Xie, G., Wang, L., Hill, C.K., and DeLeve, L.D. (2012b). Liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells promote liver regeneration in rats. *J. Clin. Invest.* *122*, 1567–1573.
- Wang, Y., Zhang, J.-S., Qian, J., Huang, G.-C., and Chen, Q. (2006). Adrenomedullin regulates expressions of transforming growth factor-beta1 and beta1-induced matrix metalloproteinase-2 in hepatic stellate cells. *Int. J. Exp. Pathol.* *87*, 177–184.

- Watanabe, A., Sohail, M.A., Gomes, D.A., Hashmi, A., Nagata, J., Sutterwala, F.S., Mahmood, S., Jhandier, M.N., Shi, Y., Flavell, R.A., et al. (2009). Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G1248–G1257.
- Weber, L.W.D., Boll, M., and Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit. Rev. Toxicol.* 33, 105–136.
- Wehr, A., Baeck, C., Heymann, F., Niemietz, P.M., Hammerich, L., Martin, C., Zimmermann, H.W., Pack, O., Gassler, N., Hittatiya, K., et al. (2013). Chemokine receptor CXCR6-dependent hepatic NK T Cell accumulation promotes inflammation and liver fibrosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 5226–5236.
- Weigand, K., Brost, S., Steinebrunner, N., Büchler, M., Schemmer, P., and Müller, M. (2012). Ischemia/Reperfusion injury in liver surgery and transplantation: pathophysiology. *HPB Surg. World J. Hepatic Pancreat. Biliary Surg.* 2012, 176723.
- Weill, F.X., Blazejewski, S., Blanc, J.F., Huet, S., Gauthier, J.M., Neaud, V., Olasso, E., Dubuisson, L., Azais-Braesco, V., Vidal-Vanaclocha, F., et al. (1997). Characterization of a new human liver myofibroblast cell line: transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor type I by transforming growth factor beta 1. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 77, 63–70.
- Weiskirchen, R., and Gressner, A.M. (2005). Isolation and culture of hepatic stellate cells. *Methods Mol. Med.* 117, 99–113.
- Weiskirchen, R., and Tacke, F. (2014). Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 3, 344–363.
- Weiskirchen, R., Weimer, J., Meurer, S.K., Kron, A., Seipel, B., Vater, I., Arnold, N., Siebert, R., Xu, L., Friedman, S.L., et al. (2013). Genetic characteristics of the human hepatic stellate cell line LX-2. *PloS One* 8, e75692.
- Westra, I.M., Oosterhuis, D., Groothuis, G.M.M., and Olinga, P. (2014). The effect of antifibrotic drugs in rat precision-cut fibrotic liver slices. *PloS One* 9, e95462.
- Wewers, M.D., Dare, H.A., Winnard, A.V., Parker, J.M., and Miller, D.K. (1997). IL-1 beta-converting enzyme (ICE) is present and functional in human alveolar macrophages: macrophage IL-1 beta release limitation is ICE independent. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 5964–5972.
- Wijesundera, K.K., Izawa, T., Tennakoon, A.H., Murakami, H., Golbar, H.M., Katou-Ichikawa, C., Tanaka, M., Kuwamura, M., and Yamate, J. (2014). M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3. *Exp. Mol. Pathol.* 96, 382–392.
- Williams, C.D., Farhood, A., and Jaeschke, H. (2010). Role of caspase-1 and interleukin-1beta in acetaminophen-induced hepatic inflammation and liver injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 247, 169–178.



- Williams, C.D., Koerner, M.R., Lampe, J.N., Farhood, A., and Jaeschke, H. (2011a). Mouse strain-dependent caspase activation during acetaminophen hepatotoxicity does not result in apoptosis or modulation of inflammation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *257*, 449–458.
- Williams, C.D., Antoine, D.J., Shaw, P.J., Benson, C., Farhood, A., Williams, D.P., Kanneganti, T.-D., Park, B.K., and Jaeschke, H. (2011b). Role of the Nalp3 inflammasome in acetaminophen-induced sterile inflammation and liver injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *252*, 289–297.
- Wirz, W., Antoine, M., Tag, C.G., Gressner, A.M., Korff, T., Hellerbrand, C., and Kiefer, P. (2008). Hepatic stellate cells display a functional vascular smooth muscle cell phenotype in a three-dimensional co-culture model with endothelial cells. *Differ. Res. Biol. Divers.* *76*, 784–794.
- Wong, L., Yamasaki, G., Johnson, R.J., and Friedman, S.L. (1994). Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J. Clin. Invest.* *94*, 1563–1569.
- Wree, A., Eguchi, A., McGeough, M.D., Pena, C.A., Johnson, C.D., Canbay, A., Hoffman, H.M., and Feldstein, A.E. (2014a). NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology* *59*, 898–910.
- Wree, A., McGeough, M.D., Peña, C.A., Schlattjan, M., Li, H., Inzaugarat, M.E., Messer, K., Canbay, A., Hoffman, H.M., and Feldstein, A.E. (2014b). NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *92*, 1069–1082.
- Wynn, T.A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest.* *117*, 524–529.
- Wynn, T.A., and Barron, L. (2010). Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin. Liver Dis.* *30*, 245–257.
- Wynn, T.A., and Cheever, A.W. (1995). Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Curr. Opin. Immunol.* *7*, 505–511.
- Xiao, J., Zhu, Y., Liu, Y., Tipoe, G.L., Xing, F., and So, K.-F. (2014). Lycium barbarum polysaccharide attenuates alcoholic cellular injury through TXNIP-NLRP3 inflammasome pathway. *Int. J. Biol. Macromol.* *69*, 73–78.
- Xie, G., Wang, X., Wang, L., Wang, L., Atkinson, R.D., Kanel, G.C., Gaarde, W.A., and Deleve, L.D. (2012). Role of differentiation of liver sinusoidal endothelial cells in progression and regression of hepatic fibrosis in rats. *Gastroenterology* *142*, 918–927.e6.
- Xu, J., Jiang, Y., Wang, J., Shi, X., Liu, Q., Liu, Z., Li, Y., Scott, M.J., Xiao, G., Li, S., et al. (2014). Macrophage endocytosis of high-mobility group box 1 triggers pyroptosis. *Cell Death Differ.* *21*, 1229–1239.
- Xu, L., Hui, A.Y., Albanis, E., Arthur, M.J., O’Byrne, S.M., Blaner, W.S., Mukherjee, P., Friedman, S.L., and Eng, F.J. (2005). Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* *54*, 142–151.

- Yamada, M., Blaner, W.S., Soprano, D.R., Dixon, J.L., Kjeldbye, H.M., and Goodman, D.S. (1987). Biochemical characteristics of isolated rat liver stellate cells. *Hepatology* 7, 1224–1229.
- Yamada, T., Imaoka, S., Kawada, N., Seki, S., Kuroki, T., Kobayashi, K., Monna, T., and Funae, Y. (1997). Expression of cytochrome P450 isoforms in rat hepatic stellate cells. *Life Sci.* 61, 171–179.
- Yan, W., Chang, Y., Liang, X., Cardinal, J.S., Huang, H., Thorne, S.H., Monga, S.P.S., Geller, D.A., Lotze, M.T., and Tsung, A. (2012). High-mobility group box 1 activates caspase-1 and promotes hepatocellular carcinoma invasiveness and metastases. *Hepatology* 55, 1863–1875.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411–415.
- Yang, C., Zeisberg, M., Mosterman, B., Sudhakar, A., Yerramalla, U., Holthaus, K., Xu, L., Eng, F., Afdhal, N., and Kalluri, R. (2003). Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 124, 147–159.
- Yi, Q., Wang, P.P., and Krahn, M. (2004). Improving the accuracy of long-term prognostic estimates in hepatitis C virus infection. *J. Viral Hepat.* 11, 166–174.
- Yin, M.-F., Lian, L.-H., Piao, D.-M., and Nan, J.-X. (2007). Tetrandrine stimulates the apoptosis of hepatic stellate cells and ameliorates development of fibrosis in a thioacetamide rat model. *World J. Gastroenterol.* 13, 1214–1220.
- Ying, C., Colonno, R., De Clercq, E., and Neyts, J. (2007). Ribavirin and mycophenolic acid markedly potentiate the anti-hepatitis B virus activity of entecavir. *Antiviral Res.* 73, 192–196.
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guillemins, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.
- Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Hicklin, D.J., Wu, Y., Yanase, K., Namisaki, T., Yamazaki, M., et al. (2003). Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 52, 1347–1354.
- Yu, C., Wang, F., Jin, C., Huang, X., Miller, D.L., Basilico, C., and McKeehan, W.L. (2003). Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* 163, 1653–1662.
- Yu, M., Wang, H., Ding, A., Golenbock, D.T., Latz, E., Czura, C.J., Fenton, M.J., Tracey, K.J., and Yang, H. (2006). HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 26, 174–179.
- Zatoński, W.A., Sulkowska, U., Mańczuk, M., Rehm, J., Boffetta, P., Lowenfels, A.B., and La Vecchia, C. (2010). Liver cirrhosis mortality in Europe, with special attention to Central and Eastern Europe. *Eur. Addict. Res.* 16, 193–201.

Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M.B., Rieder, F., Tanjore, H., and Kalluri, R. (2007). Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* 282, 23337–23347.

Zerbe, O., and Gressner, A.M. (1988). Proliferation of fat-storing cells is stimulated by secretions of Kupffer cells from normal and injured liver. *Exp. Mol. Pathol.* 49, 87–101.

Zhai, Y., Petrowsky, H., Hong, J.C., Busuttill, R.W., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2013). Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 79–89.

Zhang, Y., Huang, D., Gao, W., Yan, J., Zhou, W., Hou, X., Liu, M., Ren, C., Wang, S., and Shen, J. (2015). Lack of IL-17 signaling decreases liver fibrosis in murine schistosomiasis japonica. *Int. Immunol.* 27, 317–325.

Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y.-N., Lu, Q., Xu, H., Liu, L., and Shao, F. (2011). The NLR4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 477, 596–600.

Zhao, Y., Wang, Y., Wang, Q., Liu, Z., Liu, Q., and Deng, X. (2012). Hepatic stellate cells produce vascular endothelial growth factor via phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase/cyclooxygenase-2 pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 359, 217–223.

Zhen, M., Huang, X., Wang, Q., Sun, K., Liu, Y., Li, W., Zhang, L., Cao, L., and Chen, X. (2006). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses rat hepatic stellate cell invasion by inhibition of MMP-2 expression and its activation. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 1600–1607.

Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225.

Zhu, P., Duan, L., Chen, J., Xiong, A., Xu, Q., Zhang, H., Zheng, F., Tan, Z., Gong, F., and Fang, M. (2011). Gene silencing of NALP3 protects against liver ischemia-reperfusion injury in mice. *Hum. Gene Ther.* 22, 853–864.

Zhu, Q., Zou, L., Jagavelu, K., Simonetto, D.A., Huebert, R.C., Jiang, Z.-D., DuPont, H.L., and Shah, V.H. (2012). Intestinal decontamination inhibits TLR4 dependent fibronectin-mediated cross-talk between stellate cells and endothelial cells in liver fibrosis in mice. *J. Hepatol.* 56, 893–899.

Zimmermann, H.W., and Tacke, F. (2011). Modification of chemokine pathways and immune cell infiltration as a novel therapeutic approach in liver inflammation and fibrosis. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 10, 509–536.

Zimmermann, H.W., Seidler, S., Nattermann, J., Gassler, N., Hellerbrand, C., Zerneck, A., Tischendorf, J.J.W., Luedde, T., Weiskirchen, R., Trautwein, C., et al. (2010). Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PloS One* 5, e11049.

Zimmermann, H.W., Seidler, S., Gassler, N., Nattermann, J., Luedde, T., Trautwein, C., and Tacke, F. (2011). Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and

associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PloS One* 6, e21381.

Zimmermann, H.W., Trautwein, C., and Tacke, F. (2012). Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front. Physiol.* 3, 56.

Zindy, F., Lamas, E., Schmidt, S., Kirn, A., and Brechot, C. (1992). Expression of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-II, IGF-I and insulin receptors mRNAs in isolated non-parenchymal rat liver cells. *J. Hepatol.* 14, 30–34.



# **Annexes**



# Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages

Thomas Gicquel,\* Tatiana Victoni,\* Alain Fautrel,\*<sup>†</sup> Sacha Robert,\* Florence Gleonnec,\* Marie Guezingar,\* Isabelle Couillin,<sup>‡</sup> Véronique Catros,\* Elisabeth Boichot\* and Vincent Lagente\*

\*UMR991 INSERM/University of Rennes 1, <sup>†</sup>Histopathological platform (H2P2), University of Rennes 1, Rennes, and <sup>‡</sup>UMR7355INEM CNRS, University of Orleans, Orleans, France

## SUMMARY

1. Adenosine triphosphate (ATP) has been described as a danger signal activating the NOD-like receptor-family protein 3 (NLRP3)-inflammasome leading to the pro-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-1 $\beta$ , release in the lung. The NLRP3-inflammasome pathway has been previously described to be involved in experimental collagen deposition and the development of pulmonary fibrosis.

2. The aim of the present study was to investigate the role of the NLRP3 inflammasome pathway and P2X<sub>7</sub> purinergic receptor in the activation of human macrophages *in vitro* by ATP.

3. We showed that adenosine 5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphate tetralithium salt (ATP $\gamma$ S) and 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP), two stable analogs of ATP, are able to potentiate the release of IL-1 $\beta$  from human monocyte-derived macrophages induced by low concentration of lipopolysaccharide (LPS). However, in the same conditions no increase in IL-1 $\alpha$  and IL-6 was observed. Immunocytochemistry has shown that human macrophages natively express NLRP3 and purinergic P2X<sub>7</sub> receptors (P2X<sub>7</sub>R). NLRP3 and IL-1 $\beta$  mRNA expression were induced from LPS-primed macrophages, but also after 5-h treatment of BzATP as analysed by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. However, other inflammasome pathways (NLRP1, NLRP2, NLRC4, NLRP6 and AIM2) and P2X<sub>7</sub>R were not induced by BzATP. We observed that P2X<sub>7</sub>R antagonists, A-438079 and A-740003, were able to reduce the release of IL-1 $\beta$ , but not of IL-1 $\alpha$  and IL-6 from macrophages stimulated by ATP $\gamma$ S or BzATP.

4. The present results showed the involvement of the P2X<sub>7</sub>R-NLRP3 inflammasome pathway in the secretion of IL-1 $\beta$  from ATP-stimulated human macrophages, and suggest that P2X<sub>7</sub>R were not involved in IL-1 $\alpha$  and IL-6 release. This study also points out that repression of the P2X<sub>7</sub>R represents a novel potential therapeutic approach to control fibrosis in lung injury.

**Key words:** adenosine triphosphate, cytokines, inflammasome, macrophage, NOD-like receptor-family protein 3, purinergic receptors.

## INTRODUCTION

Several inflammatory diseases have been reported to be linked with the activation of the NOD-like receptor (NLR)-family protein (NLRP3)-inflammasome pathway including gout,<sup>1</sup> Crohn's disease,<sup>2</sup> rheumatoid arthritis<sup>3</sup> and cryopyrin-associated periodic syndrome.<sup>4</sup> In addition, it has been previously shown that collagen deposition leading to pulmonary fibrosis is also closely associated with the activation of the inflammasome-NLRP3 pathway.<sup>5–7</sup> Several inflammasome pathways have been described; however, the major pathway consists of three main effectors, NLRP3, pro-caspase-1 and the apoptosis speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) adapter, which link interactions between the former proteins.<sup>8</sup> The interaction of NLRP3 with both ASC and pro-caspase-1 leads to activation of the latter to its effective form, caspase-1, originally termed interleukin (IL)-1-converting enzyme. NLRP3 is mainly expressed by myeloid cells, as monocytes and macrophages, and is upregulated in response to pathogen-associated molecule patterns. However, lipopolysaccharide (LPS) by itself is ineffective as a stimulator of IL-1 $\beta$  release from macrophages. A second signal, such as danger-associated molecule patterns, is required to activate caspase-1.<sup>9</sup> After auto-activation through inflammasome assembly, caspase-1 cleaves pro-IL-1 $\beta$  to its active secreted form, IL-1 $\beta$ .

IL-1 $\beta$  induced the production of several other chemokines or cytokines, such as tumour necrosis factor and IL-6, or proteases, such as matrix metalloproteinase associated with neutrophil recruitment and proliferation of resident cells, mainly fibroblasts.<sup>7</sup>

Unlike monocytes, monocyte-derived macrophages or alveolar macrophages isolated from healthy volunteers stimulated with LPS did not release IL-1 $\beta$ . LPS treatment induced the steady-state levels of IL-1 $\beta$  messenger ribonucleic acid (mRNA) on macrophages, but clearly showed that the defect in IL-1 $\beta$  release is post-translational.<sup>10</sup> Extracellular adenosine triphosphate (ATP) was previously reported to play a major role to trigger synthesis and release of mature IL-1 $\beta$  after prestimulation of macrophages by an inflammatory signal, such as LPS.<sup>11</sup> ATP is described as an agonist of purinergic P2X receptor predominantly expressed

Correspondence: Vincent Lagente, UMR991 INSERM, Université de Rennes 1, Faculté de Pharmacie, 2, avenue du prof Léon Bernard, 35043 Rennes Cedex, France. Email: vincent.lagente@univ-rennes1.fr

Received 29 May 2013; revision 28 November 2013; accepted 20 December 2013.

© 2014 Wiley Publishing Asia Pty Ltd



on immune cells,<sup>12</sup> and is reported to be involved in the pathophysiology of LPS-induced lung injury, modulating airway inflammatory process and functional changes.<sup>13</sup>

The molecular mechanisms by which ATP triggers P2X receptors, inducing IL-1 $\beta$  production from macrophages, leading to inflammation and fibrosis are not clearly described. Using two stable analogues of ATP, we investigated the effects of ATP, and the role of P2X<sub>7</sub> purinergic receptors and the NLRP3-inflammatory pathway in the activation of human macrophages and the release of cytokines including IL-1 $\beta$ .

## METHODS

### Reagents

Phosphate-buffered saline, RPMI 1640, penicillin-streptomycin and L-glutamine were purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA), foetal calf serum was purchased from Hyclone (Logan, UT, USA), and HEPES and BSA were purchased from Eurobio (Les Ulis, France). Ultrapure *Escherichia coli* 0111:B4 LPS was purchased from InvivoGen (Toulouse, France); A-74003 and A-438079 from Tocris Biosciences (Bristol, UK); 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP), a selective P2X<sub>7</sub> receptor agonist; and adenosine 5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphate tetralithium salt (ATP $\gamma$ S), a non-hydrolysis P2X receptor agonist, were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA); and recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) from R&D Systems Europe (Lille, France).

### Preparation of macrophages and treatment

Peripheral blood mononuclear cells were obtained from human buffy-coat (EFS, Rennes, France) by differential centrifugation on UNI-SEP U-10 (Novamed, Jerusalem, Israel). The experiments complied with the relevant ethical requirements according to the French law number 93-5 on 4 January 1994 relative to the security of blood transfusion and biologically approved by Etablissement Français du Sang (Rennes, France). Monocytes from healthy donors were enriched using a human CD14 Microbeads separation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), and cultured at a concentration of 10<sup>6</sup> cells/mL on 24-well plates at 37°C under 5% humidified CO<sub>2</sub> in RPMI supplemented with penicillin 100 UI/mL, streptomycin 100  $\mu$ g/mL, L-glutamine 2 mmol/L and HEPES buffer 1 mmol/L supplemented with 10%

fetal calf serum. Macrophages were obtained after differentiation from monocytes by incubation with 50 ng/mL rhGM-CSF in RPMI medium. After 7 days, the supernatant was removed and cells were stimulated with various stimuli. Macrophages were incubated with 0.1  $\mu$ g/mL Ultrapure *E. coli* 0111:B4 LPS overnight. Cells were then treated with P2X<sub>7</sub>R purinergic antagonists 100  $\mu$ mol/L A-74003 (A74) or 100  $\mu$ mol/L A-438079 (A43) 1 h before treatment with 100  $\mu$ mol/L 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) or adenosine 5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphate tetralithium salt (ATP $\gamma$ S) for 5 or 6 h. Supernatants were removed and replaced with fresh medium during 24 h.

### Measurement of cytokine production

The production of IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  and IL-6 was measured in the supernatant using a Duoset enzyme-linked immunosorbent assay kit (R&D system, Abingdon, UK) according to the manufacturer's procedure.

### Real-time polymerase chain reaction analysis

Macrophages were lysed in RLT buffer (Qiagen, Hilden, Germany) supplemented with 1% 2-mercaptoethanol. Total RNA was isolated using RNeasy MicroKit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Total RNA (1  $\mu$ g) was reverse transcribed into first-strand cDNA using a High-Capacity cDNA Achieve Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's procedure. RNA quantity and purity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was carried out by the fluorescent dye SYBR Green methodology using the SYBR Green PCR Master Mix and the STEP one Plus (Applied Biosystems). Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the reference gene. Relative quantification values were expressed using the 2<sup>DDCt</sup> method<sup>14</sup> as fold changes in the target gene normalized to the reference gene and related to the expression of the controls. Primer pairs for each transcript were chosen with NCBI software <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Table 1).

### Immunocytochemistry analysis

Macrophages were cultivated in 8-well Labtek tissue culture slides for immunocytochemistry. Cells were washed by

**Table 1** Human primers designed for the present study

Human primers	Sense	Antisense
GAPDH	ATGACATCAAGAAGGTGGTG	CATACCAGGAAATGAGCTTG
NLRP3	GTGTTTCGAATCCCCTGTG	TCTGCTTCTCAGTACTTTCTG
P2X7R	GAACAATATCGACTTCCCAG	TTATCGCCTGTTTCTCGAAG
NLRP1	GGACTGACGATGACTTCTGG	ATCACAAGCAGAGACCCG
NLRP2	TCGGGTTGGTGTCTTGTTT	CAACTTAGCACCCTCATCCAG
NLRC4	CAGTCCCCTACCATAGAAG	TCAAGTTACCCAGCTGTCAG
NLRP6	TCTTATCCACTCTTTCAGGC	CTCAGAAAGGTCTCGGCAG
AIM2	TGAAACCCCGAAGATCAACAC	CCCAGTACTTCCATTTTCCCAG
IL-1 $\beta$	ATGCACCTGTACGATCACTGA	ACAAAGGACATGGAGAACC
IL-1 $\alpha$	CCTCCATTGATCATCTGTCTCTG	GCTTGGATGTTTTAGAGGTTTCAG
IL-6	AAAGAGGCACTGGCAGAAAA	TTTACCAGGCAAGTCTCTCT

phosphate-buffered saline, fixed and permeabilized by acetone at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Each step of the Ventana DABMap (Roche diagnostic, Basel, Switzerland) detection kit procedure was optimized on the Discovery instrument and was preset. Applications of the Ventana High Temperature Liquid Coverslip (Roche diagnostic) occurred throughout the automated protocol as appropriate. Likewise, the slides were rinsed between steps with Ventana Tris-based Reaction buffer (Roche diagnostic). Endogen peroxidase was blocked with Inhibitor-D 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Roche diagnostic) for 4 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . After rinsing, slides were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 60 min with a 1 : 50 dilution of rabbit polyclonal P2X<sub>7</sub>R (Abcam, Cambridge, UK), 1 : 50 dilution rabbit polyclonal NLRP3 (Sigma), and compared with isotype antibody control. Signal enhancement was carried out using the Ventana DABMap Kit (Roche diagnostic). Biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin G (H + L) secondary antibody (Vector Laboratory, Burlingame, CA, USA). Slides were then counterstained for 4 min with haematoxylin and rinsed. After removal from the instrument, slides were manually dehydrated and coverslipped. Slides were visualized with the Microscope Ni80 (Nikon, Tokyo, Japan) and NIS element software (Nikon).

### Statistical analysis

The results are expressed as means  $\pm$  SEM. Analysis of treatment effects between groups was carried out with a one-way ANOVA with Tukey's *post-hoc* test for group comparisons. The significance of differences between the groups for other parameters was determined using two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test. All analyses were carried out using Prism software (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA). For each analysis, two-sided *P*-values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

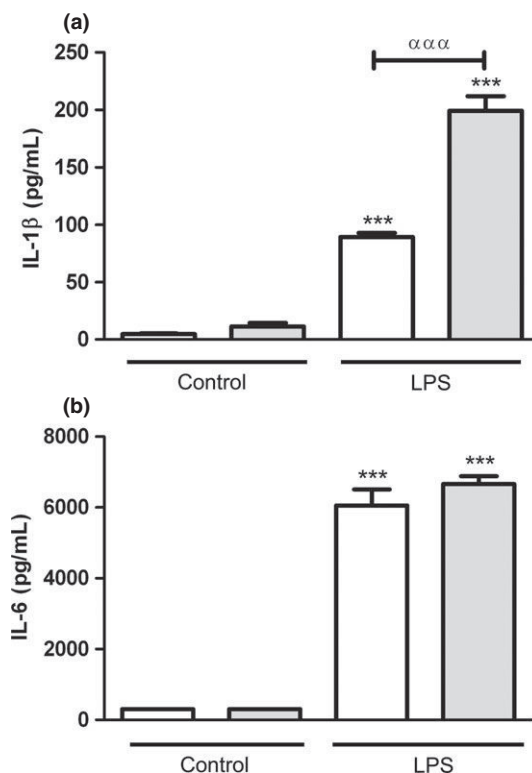
## RESULTS

### Effect of ATP $\gamma$ S on IL-1 $\beta$ production stimulated with LPS

In the absence of incubation with LPS, macrophages did not induce a significant production of IL-1 $\beta$  and IL-6, whereas incubation with 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS elicited a significant release of both cytokines (Fig. 1). However, cotreatment with both ATP $\gamma$ S 300  $\mu\text{mol}/\text{L}$  and LPS significantly increased the release of IL-1 $\beta$  in comparison to the incubation with LPS alone (Fig. 1a). In contrast, the production of IL-6 is not potentiated by ATP $\gamma$ S on LPS-treated macrophages (Fig. 1b).

### Transcript and protein expression of inflammasome pathways and P2X<sub>7</sub>R on macrophages

Immunocytochemistry showed that NLRP3 and P2X<sub>7</sub>R proteins were constitutively expressed by macrophages as compared with the control (non-targeting antibody; Fig. 2a–c). Furthermore, quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis showed that treatment with both LPS and BzATP significantly induced an increase in the expression of NLRP3 starting at 30 min and persisting after 5 h (Fig. 2d,f). P2X<sub>7</sub>R transcript levels were significantly increased after treatment with LPS individually or in combination with BzATP at 30 min (Fig. 2e), but not at 5 h



**Fig. 1** Effect of the combination of lipopolysaccharide (LPS) 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with adenosine 5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphate tetralithium salt (ATP $\gamma$ S) 300  $\mu\text{mol}/\text{L}$  on the production of interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6 from macrophages. Macrophages were incubated overnight with medium alone (control;  $\square$ ) or LPS 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  alone, and then stimulated with medium or ATP $\gamma$ S 300  $\mu\text{mol}/\text{L}$  ( $\blacksquare$ ) for 5 h. The culture supernatants were collected, and the concentrations of (a) IL-1 $\beta$  and (b) IL-6 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of one representative experiment in triplicate (one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test. \*\*\**P*  $< 0.001$  compared with the control treatment,  $\alpha\alpha\alpha$  *P*  $< 0.001$  compared with LPS alone).

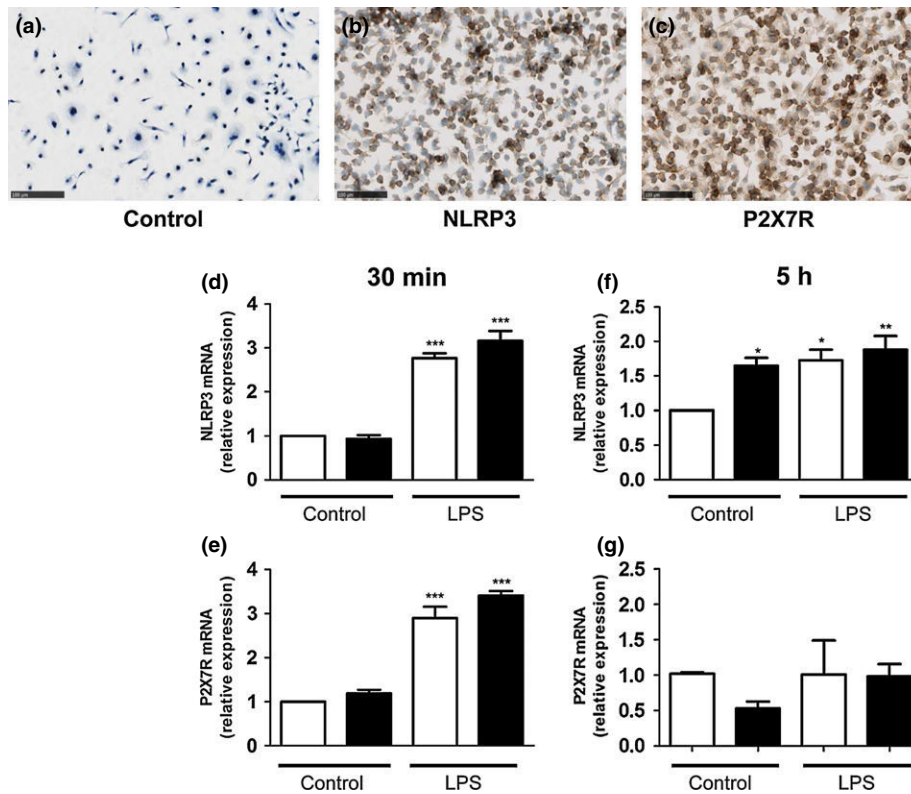
(Fig. 2g). However, the gene expression of other inflammasome pathways (NLRP1, NLRP2, NLRP4, NLRP6 and AIM2) was not modulated at 5 h (Fig. 3).

### Effect of P2X<sub>7</sub>R agonist, BzATP, on IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ and IL-6 mRNA expression

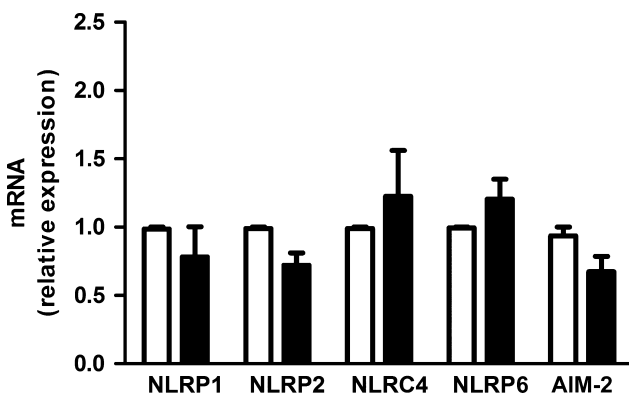
LPS (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and BzATP (250  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) induced an increase in IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  mRNA expression after 30 min, as well as 5 h of treatment (Fig. 4a–d). In contrast, the expression of IL-6 mRNA is significantly increased in response to LPS + BzATP after 30 min (Fig. 4e) and BzATP alone after 5 h of treatment (Fig. 4f).

### Effect of P2X<sub>7</sub>R antagonists on IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ and IL-6 production

To confirm whether ATP induced the release of cytokines mediated by the P2X<sub>7</sub> receptor, macrophages were incubated with purinergic receptor antagonists. After LPS treatment, IL-1 $\beta$  production was significantly increased in the presence of ATP $\gamma$ S or BzATP, whereas the treatment with A-438079 and A-740003



**Fig. 2** Expression of NOD-like receptor-family protein 3 (NLRP3) and P2X<sub>7</sub>R proteins and messenger ribonucleic acid (mRNA) in macrophages. (a–c) Protein expression was analyzed by immunocytochemistry (24 h). (d–g) Macrophages were incubated overnight with medium alone (control; □) or lipopolysaccharide (LPS) 0.1 µg/mL alone, or in combination with 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) 250 µmol/L (■) for 30 min or 5 h. mRNA expression was determined by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. The results are normalized to the gene expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The data represent the mean ± SEM of three experiments (one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 compared with the control treatment.



**Fig. 3** Expression of inflammasomes messenger ribonucleic acid (mRNA) in macrophages. Macrophages were treated by 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) 250 µmol/L (■) or medium (□) for 5 h. NLRP1, NLRP2, NLRC4, NLRP6, AIM2 mRNA (The results are normalized to the gene expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The results are expressed as mean ± SEM of one representative experiment in triplicate (two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test). Six multiple comparisons by rows.

reduced ATP-induced IL-1 $\beta$  release at 6 h (Fig. 5a,c), but not at 24 h (Fig. 5b,d). In contrast, the increased release of IL-1 $\alpha$  induced by BzATP or ATP $\gamma$ S in the presence of LPS is not reduced by treatment with purinergic receptor antagonists

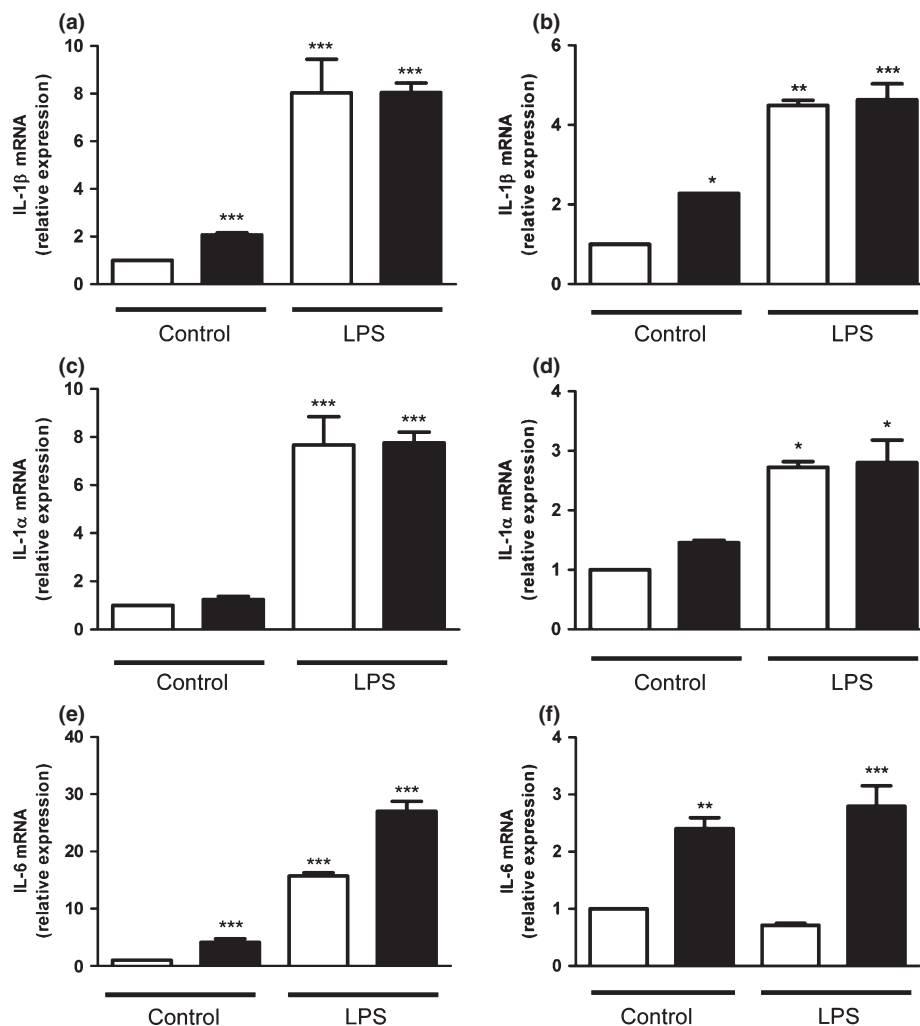
(Fig. 6a–d). Only LPS 0.1 µg/mL alone induced IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production at 24 h (Figs 5b,d, 6b,d). LPS also induced an increase in the release of IL-6 by macrophages (Fig. 6e–h). A-438079, but not A-740003 elicited a significant reduction of LPS + BzATP-induced IL-6 release at 6 and 24 h (Fig. 6e–h).

## DISCUSSION

The present study showed that the activation of human macrophages by a combination of LPS + ATP elicited the release of IL-1 $\beta$ , and this production is mainly as a result of the activation of the P2X<sub>7</sub> purinergic receptor and NLRP3-inflammasome pathway.

NLRP3-inflammasome pathway activation appears as the cornerstone of many inflammatory diseases including pulmonary fibrosis.<sup>5,6</sup> Resident macrophages have been described to be involved in chronic inflammation and in tissue remodelling leading to pulmonary fibrosis.<sup>15</sup> In the current study, we developed an experimental model of human macrophages differentiated from peripheral blood monocytes by GM-CSF. Thus, in these conditions, these cells represent a model of alveolar macrophages.<sup>16</sup>

Here, we showed that ATP $\gamma$ S (300 µmol/L) or BzATP (250 µmol/L), two stable analogues of ATP, are able to potentiate the release of IL-1 $\beta$  induced by a low concentration of LPS. In similar conditions, no significant increase in IL-1 $\alpha$  and IL-6 was observed. These results are consistent with previous studies



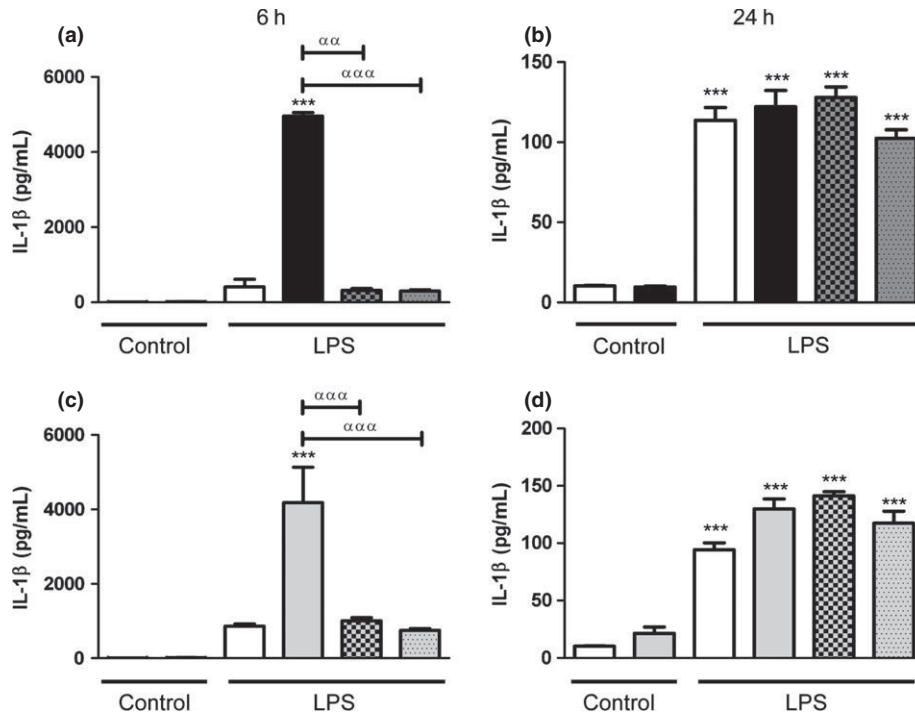
**Fig. 4** Messenger ribonucleic acid (mRNA) expression for (a, b) interleukin (IL)-1 $\beta$ , (c, d) IL-1 $\alpha$  and (e, f) IL-6 after stimulation of macrophages with lipopolysaccharide (LPS) 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) 250  $\mu\text{mol}/\text{L}$ . Macrophages were incubated overnight with medium alone (control;  $\square$ ), or LPS 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  alone and then stimulated with BzATP 250  $\mu\text{mol}/\text{L}$  ( $\blacksquare$ ) for (a, c, e) 30 min or (b, d, f) 5 h. mRNA expression was determined by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. The results are normalized to the gene expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of one representative experiment in triplicate (one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with the control treatment.

showing that human macrophages, unlike monocytes, require two independent stimuli to activate caspase-1-NLRP3-inflammasome: first, a Toll-like receptor (TLR)-dependent stimulus, which allows the transcription and translation of pro-IL-1 $\beta$ , and a second stimulus such as ATP to activate caspase-1 to cleave pro-IL-1 $\beta$ .<sup>17</sup> Accordingly, LPS induces the transcription of pro-IL-1 $\beta$  through the activation of TLR, and we showed a significant increase of mRNA expression of IL-1 $\beta$  and NLRP3 from LPS-primed macrophages, but also after BzATP treatment at 5 h by reverse transcription (RT)-qPCR.

Although NLRP1 inflammasome should be activating after ATP release, extracellular ATP has been suggested to selectively activate NLRP3 inflammasome.<sup>18</sup> We presently observed that BzATP only induced the RNA expression of the NLRP3 inflammasome pathway, but not of other inflammasome pathways.

Extracellular ATP is considered as a danger signal that activates the P2X<sub>7</sub> receptor, leading to NLRP3 activation and mature IL-1 $\beta$  production.<sup>19</sup> P2X<sub>7</sub> receptors belong to the family of

ATP-activated ionotropic P2X receptors, which include seven homomeric receptor subtypes (P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub>).<sup>12</sup> P2X<sub>7</sub> receptors have been involved in inflammatory and immunological responses, and their activation modulates pro-inflammatory cytokines production by LPS-challenged macrophages. P2X<sub>7</sub> receptors are known to be implicated in the maturation and release of the pro-inflammatory cytokine, IL-1 $\beta$ , in monocytes and macrophages. P2X<sub>7</sub>R-deficient mice have less inflammation, and reduced pulmonary fibrosis in terms of lung collagen and matrix-remodelling proteins.<sup>6</sup> Mechanisms underlying the release of pro-inflammatory cytokines through the activation of P2X<sub>7</sub>R and NLRP3-inflammasome remain unclear. We showed here by immunocytochemistry that human monocyte-derived macrophages natively express NLRP3 and P2X<sub>7</sub> receptors. We therefore hypothesized that ATP-induced IL-1 $\beta$  release is able to activate human macrophages through the stimulation of P2X<sub>7</sub> receptor. Then we investigated the effects of selective P2X<sub>7</sub> receptor antagonists,<sup>20,21</sup> A-438079 and A-740003, on the IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$



**Fig. 5** Effect of P2X<sub>7</sub>R antagonists: A-740003 (100 μmol/L; A74) and A-438079 (100 μmol/L; A43) on interleukin (IL)-1β production from macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS) 0.1 μg/mL, (a, b) 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) 250 μmol/L or (c, d) adenosine 5'-[γ-thio]triphosphate tetralithium salt (ATPγS) 300 μmol/L. (a, c) Cells were incubated overnight with medium alone (control; □), or LPS 0.1 μg/mL alone, and were pretreated with vehicle (control; □), A74 100 μmol/L (▣) or A43 100 μmol/L (▤) for 1 h, and then stimulated or not with BzATP 250 μmol/L (■) or ATPγS 300 μmol/L (▨) for 6 h. (b, d) Supernatants were removed and replaced with fresh medium during 24 h. The results are expressed as mean ± SEM of one representative experiment in triplicate (one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test). \*\*\**P* < 0.001 compared with the control treatment, αα*P* < 0.01, ααα*P* < 0.001 compared with positive control.

and IL-6 release by macrophages. We clearly observed that both A-438079 and A-740003 are able to significantly reduce the release of IL-1β, but not of IL-1α and IL-6 from macrophages stimulated by ATPγS or BzATP. The present results are consistent with those of Ward *et al.*<sup>19</sup> showing that P2X<sub>7</sub>R antagonists, KN62 and A-438079, significantly attenuated 300 μmol/L BzATP-induced IL-1β release on monocyte-derived macrophages pretreated with LPS. Using A-438079 (200 μmol/L) and A-740003 (100 μmol/L), Riteau *et al.*<sup>6</sup> also showed a significant decrease of ATP release from epithelial cells. In the same way, application of A-438079 to peritoneal macrophages significantly decreased, in a dose-dependent manner, the quantity of IL-1β released by the addition of BzATP.<sup>22</sup> Therefore, the present data confirm the involvement of P2X<sub>7</sub>R and the NLRP3-inflammasome pathway in the ATP-induced IL-1β release from macrophages.

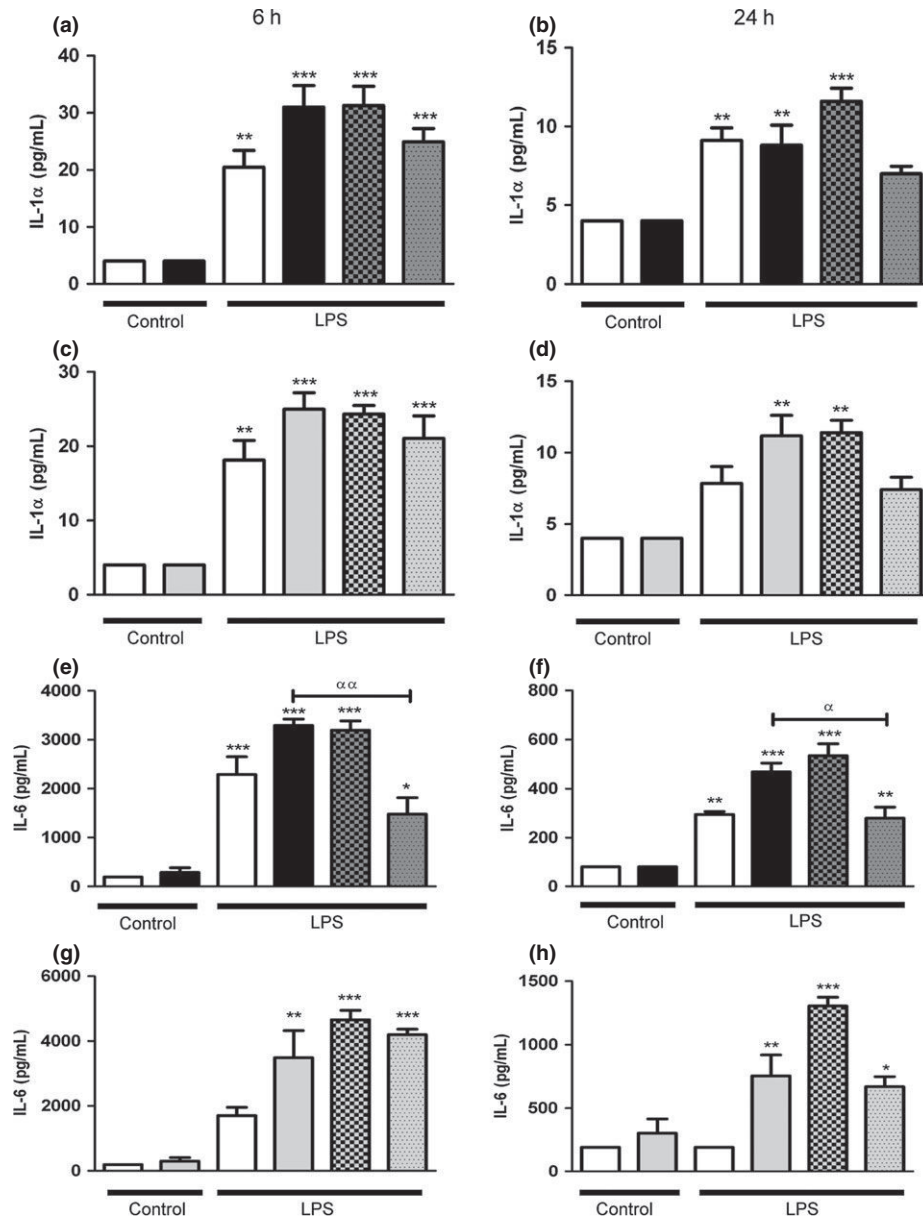
It has been previously reported that IL-1α release occurs through the P2X<sub>7</sub> receptor, and follows a similar time-course to that of IL-1β.<sup>11</sup> The physiological meaning of P2X<sub>7</sub>R-dependent pro-IL-1α cleavage is not clear, because this cytokine, in contrast to pro-IL-1β, is a full agonist at IL-1 receptors. In response to ATP, macrophages also release IL-1Ra through P2X<sub>7</sub>R.<sup>23</sup> Yazdi *et al.*<sup>24</sup> showed that IL-1β release was completely abolished in NLRP3 KO or ASC KO murine bone marrow dendritic cells, whereas the release of IL-1α is only partially dependant on NLRP3 and ASC after monosodium urate crystals stimulation. According to Ward *et al.*<sup>19</sup>, LPS treatment significantly increases

the production of IL-1α from monocyte-derived macrophages. However, we observed that IL-1α release is not modified by the treatment with BzATP. Furthermore, we have shown that LPS-treatment, but not BzATP, significantly induce IL-1α mRNA expression. Similarly, the pretreatment with both P2X<sub>7</sub> receptor antagonists, A-438079 or A-740003, did not reduce IL-1α release, suggesting that IL-1α production was not associated with the activation of P2X<sub>7</sub>R.

Although ATP is found in the synovial fluid from joint patients where a number of P2X<sub>7</sub>R-expressing cells including macrophages are present,<sup>25,26</sup> and the P2X<sub>7</sub>R has also been implicated in the secretion of IL-6 from fibroblasts,<sup>27</sup> no evidence of the involvement of the activation of P2X<sub>7</sub>R in IL-6 release from human macrophages has been reported. BzATP did not also induce IL-6 release from human thyrocytes.<sup>28</sup> Accordingly, we observed that the production of IL-6 was significantly increased after LPS treatment, but is not affected by treatment with ATPγS or BzATP. Although purinergic agonists seemed to not be involved in IL-6 release, we showed that A-438079 pretreatment decreased IL-6 release after BzATP. However, a lack of selectivity for A-438079 at this concentration could explain such an effect.

Furthermore, McGeough *et al.*<sup>29</sup> proposed that IL-1β and IL-6 might not be coupled in the pathogenesis of inflammasome-mediated mouse models; instead, IL-6 is simply a marker of inflammation without a significant causative role.

In our model, IL-6 mRNA expression was increased after 5 h of BzATP addition, but not in the presence of LPS. It has been



**Fig. 6** Effect of P2X<sub>7</sub>R antagonists: A-740003 (100 μmol/L; A74) and A-438079 (100 μmol/L; A43) on (a–d) interleukin (IL)-1α and (e–h) IL-6 production from macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS) 0.1 μg/mL, 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) 250 μmol/L or adenosine 5'-[γ-thio]triphosphate tetralithium salt (ATPγS) 300 μmol/L. (a, c, e, g) Cells were incubated overnight with medium alone (control; □), or LPS 0.1 μg/mL alone, and were pretreated with vehicle (control; □), A74 100 μmol/L (■) or A43 100 μmol/L (▨) for 1 h, and then stimulated or not with BzATP 250 μmol/L (■) or ATPγS 300 μmol/L (□) for 6 h. (b, d, f, h) Supernatants were removed and replaced with fresh medium during 24 h. The results are expressed as mean ± SEM of one representative experiment in triplicate (one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 compared with the control treatment, <sup>α</sup>*P* < 0.05, <sup>αα</sup>*P* < 0.01 compared with positive control.

shown that BzATP, a P2XR agonist, exposure results in a dose-dependent increase in the activation of the nuclear translocation of the transcription factor, nuclear factor-κB, in monocytes.<sup>30</sup> Furthermore MacKenzie *et al.*<sup>31</sup> have shown that P2X<sub>7</sub>R stimulation can initiate local accumulation of IL-1β on THP-1 monocytes. Further investigations might be necessary to better understand the involvement of purinergic receptors in IL-6 release from macrophages.

The current study showed the involvement of the P2X<sub>7</sub>R–NLRP3 pathway in the secretion of IL-1β from macrophages, and suggests that P2X<sub>7</sub>R were not involved in IL-1α and IL-6

release. However, the exact role of ATP in the pathogenesis of pulmonary fibrosis is still unknown and requires further investigation. The present work also points out that blockage of the P2X<sub>7</sub> receptor and NLRP3-inflammasome represents a potential therapeutic approach to control IL-1β and fibrosis in lung injury.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) project (ANR2010 MIDI01202) and INSERM. The authors thank Florian Cabillic, Benoit Dessarthe, Aurélie

The authors declare any financial support or relationships that may pose a conflict of interest.

## DISCLOSURE

The authors declare any financial support or relationships that may pose a conflict of interest.

## REFERENCES

- Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; **440**: 237–41.
- Villani AC, Lemire M, Fortin G *et al.* Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* 2009; **41**: 71–76.
- Rosengren S, Hoffman HM, Bugbee W, Boyle DL. Expression and regulation of cryopyrin and related proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Ann. Rheum. Dis.* 2005; **64**: 708–14.
- Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 $\beta$ -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 2004; **20**: 319–25.
- Gasse P, Riteau N, Charron S *et al.* Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009; **179**: 903–13.
- Riteau N, Gasse P, Fauconnier L *et al.* Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; **182**: 774–83.
- Gasse P, Mary C, Guenon I *et al.* IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 2007; **117**: 3786–99.
- Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Mol. Cell* 2002; **10**: 417–26.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; **440**: 228–32.
- Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF *et al.* Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 $\beta$  in monocytes and macrophages. *Blood* 2009; **113**: 2324–35.
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E *et al.* The P2X7 receptor: A key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* 2006; **176**: 3877–83.
- Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol. Rev.* 2007; **63**: 641–83.
- Monção-Ribeiro LC, Cagido VR, Lima-Murad G *et al.* Lipopolysaccharide-induced lung injury: Role of P2X7 receptor. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2011; **179**: 314–25.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402–8.
- Okuma T, Terasaki Y, Kaikita K *et al.* C-C chemokine receptor 2 (CCR2) deficiency improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuation of both macrophage infiltration and production of macrophage-derived matrix metalloproteinases. *J. Pathol.* 2004; **204**: 594–604.
- Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* 2010; **5**: e8668.
- Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG *et al.* Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* 2007; **26**: 433–43.
- Ali SR, Timmer AM, Bilgrami S *et al.* Anthrax toxin induces macrophage death by p38 MAPK inhibition but leads to inflammasome activation via ATP leakage. *Immunity* 2011; **35**: 34–44.
- Ward JR, West PW, Ariaans MP *et al.* Temporal interleukin-1 $\beta$  secretion from primary human peripheral blood monocytes by P2X7-independent and P2X7-dependent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 2010; **285**: 23147–58.
- Nelson DW, Gregg RJ, Kort ME *et al.* Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J. Med. Chem.* 2006; **49**: 3659–66.
- Honore P, Donnelly-Roberts D, Navomic MT *et al.* A-740003 [N-(1-((cyanoinimino)(5-quinolinylamino) methyl)amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; **319**: 1376–85.
- McGaraughty S, Chu KL, Namovic MT *et al.* P2X7-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience* 2007; **146**: 1817–28.
- Wilson HL, Francis SE, Dower SK, Crossman DC. Secretion of intracellular IL-1 receptor antagonist (type 1) is dependent on P2X7 receptor activation. *J. Immunol.* 2004; **173**: 1202–8.
- Yazdi AS, Guarda G, Riteau N *et al.* Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2010; **107**: 19449–54.
- Tran CN, Lundy SK, Fox DA. Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* 2005; **12**: 183–9.
- Ryan LM, Rachow JW, McCarty DJ. Synovial fluid ATP: A potential substrate for the production of inorganic pyrophosphate. *J. Rheumatol.* 1991; **18**: 716–20.
- Solini A, Chiozzi P, Morelli A, Fellin R, Di Virgilio F. Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release. *J. Cell Sci.* 1999; **112**: 297–305.
- Caraccio N, Monzani F, Santini E *et al.* Extracellular adenosine 5'-triphosphate modulates interleukin-6 production by human thyrocytes through functional purinergic P2 receptors. *Endocrinology* 2005; **146**: 3172–8.
- McGeough MD, Pena CA, Mueller JL *et al.* Cutting edge: IL-6 is a marker of inflammation with no direct role in inflammasome-mediated mouse models. *J. Immunol.* 2012; **189**: 2707–11.
- Aga M, Johnson CJ, Hart AP *et al.* Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X(7). *J. Leukoc. Biol.* 2002; **72**: 222–32.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1 $\beta$  by microvesicle shedding. *Immunity* 2001; **15**: 825–35.

# IL-1 $\beta$ production is dependent of the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages

Thomas Gicquel,<sup>\*,†,1</sup> Sacha Robert,<sup>\*</sup> Pascal Loyer,<sup>\*</sup> Tatiana Victoni,<sup>\*</sup> Aude Bodin,<sup>\*</sup> Catherine Ribault,<sup>\*</sup> Florence Gleonnec,<sup>\*</sup> Isabelle Couillin,<sup>‡</sup> Elisabeth Boichot,<sup>\*</sup> and Vincent Lagente<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Unité Mixte de Recherche 991, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Rennes 1, Rennes, France; <sup>†</sup>Laboratoire de Toxicologie Biologique et Médico-Légale, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Rennes, France; and <sup>‡</sup>Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7355, Université d'Orleans, Orleans, France

**ABSTRACT** The Nod-like receptor family protein 3 (NLRP3)-inflammasome pathway is known to be activated by danger signals such as monosodium urate (MSU). We investigated the role of P2 purinergic receptors in the activation of NLRP3-inflammasome pathway after MSU treatment of primary human monocyte-derived macrophages (MDMs). After initial stimulation with a low concentration of LPS (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), a 6 h treatment with MSU crystals (250, 500, and 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) induced the MDMs to release IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , and IL-6 in a dose-dependent manner. Moreover, the caspase 1 inhibitor Z-YVAD-FMK and the cathepsin B inhibitor CA-074Me reduced production of IL-1 $\beta$  in a dose-dependent manner after LPS + MSU treatment. We used real-time reverse transcription-quantitative PCR to show that treatment with LPS and MSU (500  $\mu\text{g/ml}$ ) induced significantly greater expression of NLRP3 and IL-1 $\beta$  than after treatment with LPS. We also found that MSU treatment induced P2X purinergic receptor 7 (P2X7R) mRNA and protein expression. Furthermore, addition of the P2X7 purinergic receptor antagonist A-740003 significantly impeded IL-1 $\beta$  production and pro-IL-1 $\beta$  cleavage after treatment with LPS + MSU. Remarkably, RNA silencing of P2X7R (but not P2X4R) inhibited the release of IL-1 $\beta$  and other M1 macrophage cytokines (such as IL-1 $\alpha$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ ) from MDMs stimulated with LPS + MSU. Taken as a whole, our results show that P2 purinergic receptors and the NLRP3 inflammasome pathway are involved in the secretion of IL-1 $\beta$  from MSU-stimulated human macrophages. This pathway may constitute a novel therapeutic target for controlling the inflammatory process in several associated pathologies.—Gicquel, T., Robert, S., Loyer, P., Victoni, T., Bodin, A., Ribault, C., Gleonnec, F., Couillin, I., Boichot, E., Lagente, V. IL-1 $\beta$  production is dependent of

the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *FASEB J.* 29, 000–000 (2015). [www.fasebj.org](http://www.fasebj.org)

*Key Words:* cytokines · NLRP3 inflammasome · uric acid · P2X7 receptor

The Nod-like receptor family protein 3 (NLRP3) is mainly expressed by myeloid cells (including monocytes and macrophages) and is up-regulated by pathogen-associated molecular patterns (1). Activation of the NLRP3-inflammasome pathway appears to be the cornerstone of many inflammatory diseases, including Crohn disease (2), rheumatoid arthritis (3), cryopyrin-associated periodic syndrome (4), idiopathic pulmonary fibrosis (5, 6), and gout (7).

Although several inflammasome pathways have been described, the canonical pathway consists of 3 main effectors: NLRP3, procaspase 1, and the apoptosis speck-like protein containing a caspase recruitment domain adapter that mediates the interactions between the NLRP3 and the procaspase 1. The final outcome of the NLRP3 inflammasome assembly is the cleavage of cytosolic pro-IL-1 $\beta$  into the mature proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  by the activated caspase 1 (8). Extracellular ATP is the best-known danger signal in NLRP3 activation [*via* stimulation of the P2X7 purinergic receptor (P2X7R) (9, 10), potassium efflux (11), and recruitment of pannexin-1 channel (12)].

Uric acid (a product of purine catabolism) is released from damaged cells and acts as a danger signal in response to a variety of stress factors (13). At high local concentrations, uric acid precipitates to form monosodium urate (MSU) crystals, which in turn cause the clinical symptoms of inflammation observed in gout. Several mechanisms are known to be involved in MSU recognition and cell activation, such as reactive oxygen species production, CD14,

Abbreviations: AIM2, absent in melanoma 2; BzATP, 2' (3')-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine-5'-triphosphate; CCL4, chemokine (C-C motif) ligand 4; FCS, fetal calf serum; GAPDH, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; HSC-70, heat shock 70 kDa protein 8; LDH, lactate dehydrogenase; MDM, monocyte-derived macrophage; MSU, monosodium urate;

(continued on next page)

<sup>1</sup> Correspondence: UMR991 INSERM, Université de Rennes 1, Faculté de Pharmacie, 2, Avenue du Prof Léon Bernard, 35043 Rennes cedex, France. E-mail: [thomas.gicquel@univ-rennes1.fr](mailto:thomas.gicquel@univ-rennes1.fr)

doi: 10.1096/fj.14-267393



TLR-2, TLR-4, myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), NF- $\kappa$ B, and cathepsin B (6, 14–17). Activation of the inflammasome by MSU involves lysosomal damage, the release of cathepsin B into the cytosol (18–20), and then activation of NLRP3 *via* an unidentified mechanism. However, it is thought that purinergic receptors (such as P2X7R) and extracellular ATP contribute to the IL-1 $\beta$  release triggered by MSU (21, 22).

Until recently, it was widely considered that P2X7R is the only purinergic receptor involved in triggering IL-1 $\beta$  secretion in macrophages (23). However, other purinergic receptors, such as P2X4R (24, 25), P2Y2R (26), and P2Y6R (27), have recently been implicated in this process.

Although the mechanisms underlying the release of proinflammatory cytokines through the activation of P2X7 and the NLRP3-inflammasome after particle treatment are now better understood (28), the role of other purinergic receptors remains unclear. The objective of the present study was to further characterize cytokine production and the activation of the NLRP3 pathway after MSU stimulation in primary human monocyte-derived macrophages (MDMs) and to identify the purinergic receptors mediating NLRP3 activation.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

PBS, RPMI 1640, penicillin–streptomycin, and L-glutamine were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA); fetal calf serum (FCS) was from Hyclone (Logan, UT, USA); and acrylamide, SDS, Tris, HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid], and bovine serum albumin were from Eurobio (Les Ulis, France). Bradford protein assay and precision plus protein dual-color standards were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Ultrapure *Escherichia coli* O111:B4 LPS was purchased from InvivoGen (Toulouse, France); A-74003 and 5-BDBD from Tocris (Bristol, United Kingdom); and recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) and recombinant human IL-1 $\beta$  from R&D Systems Europe (Lille, France). Ivermectine, saponin, (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) (MTT), lactate dehydrogenase (LDH), 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP), and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Z-YVAD-FMK and CA-O74Me were provided from Calbiochem (Darmstadt, Germany). The antibodies against heat shock 70 kDa protein 8 (HSC-70; sc-7298) and IL-1 $\beta$  were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) and from R&D Systems (Minneapolis, USA), respectively. The antibodies against P2X7R and P2X4R were from Alomone (Jerusalem, Israel) and against NLRP3 from Millipore (Molsheim, France).

(continued from previous page)

MTT, (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide); NLRP3, Nod-like receptor (NLR)-family protein 3; P2X7R, P2X purinergic receptor 7; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; qPCR, real-time reverse transcription–quantitative PCR; rhGM-CSF, recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor; siRNA, small interfering RNA; TBS, Tris-buffered saline; THP-1, human acute monocytic leukemia cell line

### Crystal preparation

MSU crystals were prepared by recrystallization from uric acid, as previously described (7). Briefly, the crystals were obtained by dissolving 1.68 mg of MSU in 500 ml of 0.01 M NaOH preheated to 70°C (pH 7.1–7.2). The solution was slowly and continuously agitated at room temperature until crystals formed. The crystals were washed twice with 100% ethanol, dried, autoclaved, and weighed under sterile conditions. Crystals were resuspended in PBS by sonication and examined with phase microscopy before experiments. The crystal size ranged from 2 to 20  $\mu$ m.

### Preparation and treatment of MDMs

Peripheral blood mononuclear cells were obtained from human buffy coat (Etablissement Français du Sang, Rennes, France) by differential centrifugation on UNI-SEP U-10 (Novamed, Jerusalem, Israel). The experiments were performed in compliance with the French legislation on blood donation and blood product use and safety. Monocytes from healthy donors were enriched using a human CD14 separation kit (Microbeads; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), plated at a density of  $1 \times 10^6$  cells per well in 24-well plates and cultured at 37°C with 5% humidified CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium supplemented with 100 IU/ml penicillin–100  $\mu$ g/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 1 mM HEPES buffer supplemented with 10% FCS. Macrophages were obtained after differentiation from monocytes by incubation with 50 ng/ml rhGM-CSF in RPMI medium. After 7 d, the supernatant was removed and cells were stimulated with various treatments. Macrophages were incubated overnight with 0.1  $\mu$ g/ml Ultrapure *E. coli* O111:B4 LPS. Cells were then incubated with A-74003, 5-BDBD, ivermectin, CA-O74Me, or Z-YVAD-FMK 1 h before a 6-h incubation with MSU or BzATP.

### THP-1 cells culture and treatment

THP-1 (human acute monocytic leukemia cell line) cells were cultured at a density of  $1 \times 10^6$  cells/well in 6-well plates at 37°C (5% humidified CO<sub>2</sub>) in 2 ml/well of RPMI medium supplemented with 100 IU/ml penicillin–100  $\mu$ g/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, and 10% FCS. The cells were differentiated by stimulation with 10 ng/ml of PMA in RPMI medium for 3 d, followed by a day of incubation in PMA-free RPMI medium supplemented with 2% FCS. The supernatant was removed and cells were stimulated with various treatments. Differentiated THP-1 cells were incubated overnight with 0.1  $\mu$ g/ml Ultrapure *E. coli* O111:B4 LPS. Cells were then treated with 250, 500, or 1000  $\mu$ g/ml MSU for 6 h.

### Cell viability

Cytotoxicity was evaluated using the MTT and LDH release colorimetric assays. Briefly, cells were seeded in 24-well plates and treated with 0, 250, 500, or 1000  $\mu$ g/ml MSU or saponin 0.05% (positive control for LDH release) for 6 h. The supernatant was removed, and LDH release was measured using the Cytotoxicity Detection kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. After medium removal, 500  $\mu$ l of RPMI medium containing MTT (0.5 mg/ml) was added to each well and incubated for 2 h at 37°C. The water-insoluble formazan was dissolved in 500  $\mu$ l of DMSO, and absorbance was measured at 540 nm.

## Detection of P2X4R and P2X7R protein on the MDMs using flow cytometry

Twenty-four hours after stimulation by MSU, the culture medium of MDMs was removed, the cell monolayers were washed with PBS, and the cells were detached with trypsin and washed twice in PBS before fixation for 10 min using 4% paraformaldehyde buffered with PBS. The paraformaldehyde was discarded, and MDMs were resuspended in PBS supplemented with 5% non-immune donkey serum for blocking nonspecific sites. Isotype control immunoglobulins and P2X4R and P2X7R primary antibodies were diluted 1:200 and incubated with cells for 2 h. After washing with PBS, cells were incubated with secondary FITC-conjugated antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) and analyzed by flow cytometry (FACS-Calibur; Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) to quantify the fluorescence emitted by cells on the FL1-H channel.

## Electroporation of human primary MDMs

After 6 d of differentiation, the MDMs were trypsinized and electroporated using the Neon transfection system (Life Technologies) at the SynNanoVect core facility (Biogenouest, Rennes, France). Sets of small interfering RNA (siRNA) for P2X4R and P2X7R (siP2X7R and siP2X4R, respectively; On-Target Plus Human siRNA Smartpool, Thermo Scientific Dharmacon, Lafayette, CO, USA) were used to knock down purinergic receptor expression. Control experiments were performed with nontargeting (mock) siRNA (On-Target Plus Human siRNA Smartpool; Thermo Scientific Dharmacon). After counting, macrophages were centrifuged at 450 g for 10 min and resuspended in Buffer R (Life Technologies) at a density of  $1 \times 10^6$  cells/ml. A total of 100 pmol of siRNA per  $10^6$  cells were immediately added, and electroporation was performed as previously reported (29) with a 1600 V pulse for 30 ms. After electroporation, macrophages were cultured in 24-well plates at a density of  $1 \times 10^6$  cells/well.

## Immunoblotting analysis

MDMs were lysed in 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1% Tween-20,

0.1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, 10 mM β-glycerophosphate, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 100 μg/ml benzamide, and 5 μg/ml aprotinin, leupeptin, soybean trypsin inhibitor. Protein concentrations were quantified using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad). Twenty-five micrograms of proteins were resolved on SDS-PAGE and transferred onto PVDF (Bio-Rad). Nonspecific binding sites were blocked with Tris-buffered saline (TBS) containing 4% bovine serum albumin for 1 h at room temperature. Then membrane were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted at 1:2000 in TBS containing 4% advanced blocking agent (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA). Filters were washed 3 times with TBS and incubated with appropriate secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase for 1 h at room temperature. Proteins were visualized with Supersignal (Pierce, Rockford, IL, USA).

## Measurement of cytokine production

The concentrations of IL-1β, IL-1α, IL-6, and TNF-α in the culture medium were measured using Duoset ELISA kits (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom), according to the manufacturer's instructions. Cell supernatants were also analyzed with a cytokine protein array (Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A; R&D Systems), again according to the manufacturer's instructions.

## Real-time reverse transcription–quantitative PCR (qPCR) analysis

Macrophages were lysed in buffer RLT (Qiagen, Hilden, Germany) supplemented with 1% 2-mercaptoethanol. Total RNA was isolated using an RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. RNA quantity and purity were assessed spectrophotometrically (Nanodrop ND-1000; Nyxor Biotech, Paris, France). Total RNA (1 μg) was reverse transcribed into first-strand cDNA using a High-Capacity cDNA Achieve Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) following the manufacturer's procedure. qPCR was performed using the Sybr Green fluorescent dye methodology with Sybr Green PCR Master Mix and Step One Plus equipment (Applied Biosystems). Primer pairs for each transcript were chosen with National Center for Biotechnology Information software (Table 1). Human

TABLE 1. Human primers used in this study

Human primers	Sense	Antisense
GAPDH	ATGACATCAAGAAGGTGGTG	CATACCAGGAAATGAGCTTG
NLRP1	GGACTGACGATGACTTCTGG	ATCACAAAGCAGAGACCCG
NLRP2	TCGGGTTGGTGTCTTGTTT	CAACTTAGCACCCCTCATCCAG
NLRP3	GTGTTTCGAATCCCACTGTG	TCTGCTTCTCAGTACTTTTCTG
NLRC4	CAGTCCCCTCACCATAGAAG	TCAAGTTACCCAGCTGTCCAG
NLRP6	TCTTCATCCACTCTTTCAGGC	CTCAGAAAGGTCTCGGCAG
AIM-2	TGAAACCCCGAAGATCAACAC	CCCAGTACTTCCATTTTCCCG
IL-1β	ATGCACCTGTACGATCACTGA	ACAAAGGACATGGAGAACC
IL-1α	CCTCCATTGATCATCTGTCTCTG	GCTTGGATGTTTTAGAGTTTTCAG
IL-6	AAAGAGGCCTGGCAGAAAA	TTTACCAGGCAAGTCTCCT
P2X1R	GGTGTGGGATTGCGTTT	TTAGGCAGGATGTGAAGCAG
P2X2R	CATCCTGCTCTACTTCCGTGTG	GTGATCCCCCTTGACCTTGG
P2X3R	CTGGTATACGGGAATGCTGG	TCTTGGCTTTGTAAGTGGTCCG
P2X4R	TGTGGCGGATTATGTGATACC	GTGGTGCATCTGGAATCTC
P2X5R	TCTTGATAAAGCTGCCTCTGAG	CTGCGTCTCGTAATATCTGG
P2X6R	TTTGGGATCGTGGTCTATGTG	TTGATCTGAGTGACGGAAACC
P2X7R	GAACAATATCGACTTCCCCGG	TTATCGCCTGTTTCTCGGAAG
P2Y2R	TCTACACCAACCTTTACTGACG	GTAAGACGCCAGACACC
P2Y6R	CTCCTACAGAAACTCACAGCC	CCGGACACAATGGCAAATATG

glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the reference gene. Relative quantification values were expressed using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (30). Relative expressions were calculated as  $1000 \times 2^{-\Delta Ct}$ .

### Statistical analysis

Values are provided as means  $\pm$  SEM. Intergroup differences as a function of the treatment were probed in a 1-way ANOVA with the Tukey *post hoc* test. Intergroup differences in other parameters were tested in a 2-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* correction. All statistical analyses were performed by Prism software, version 5.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). All tests were 2 sided, and the threshold for statistical significance was set to  $P < 0.05$ .

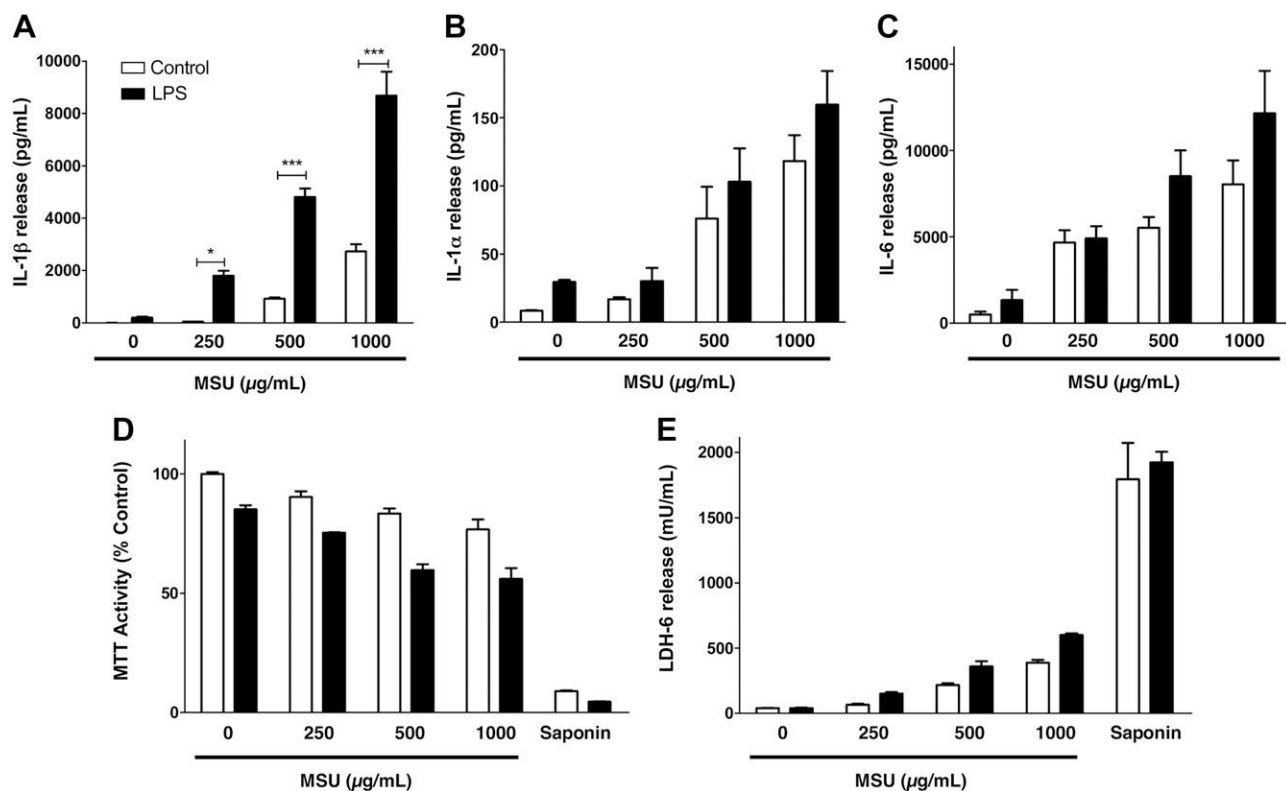
## RESULTS

### Effect of MSU on proinflammatory cytokines production after stimulation with LPS

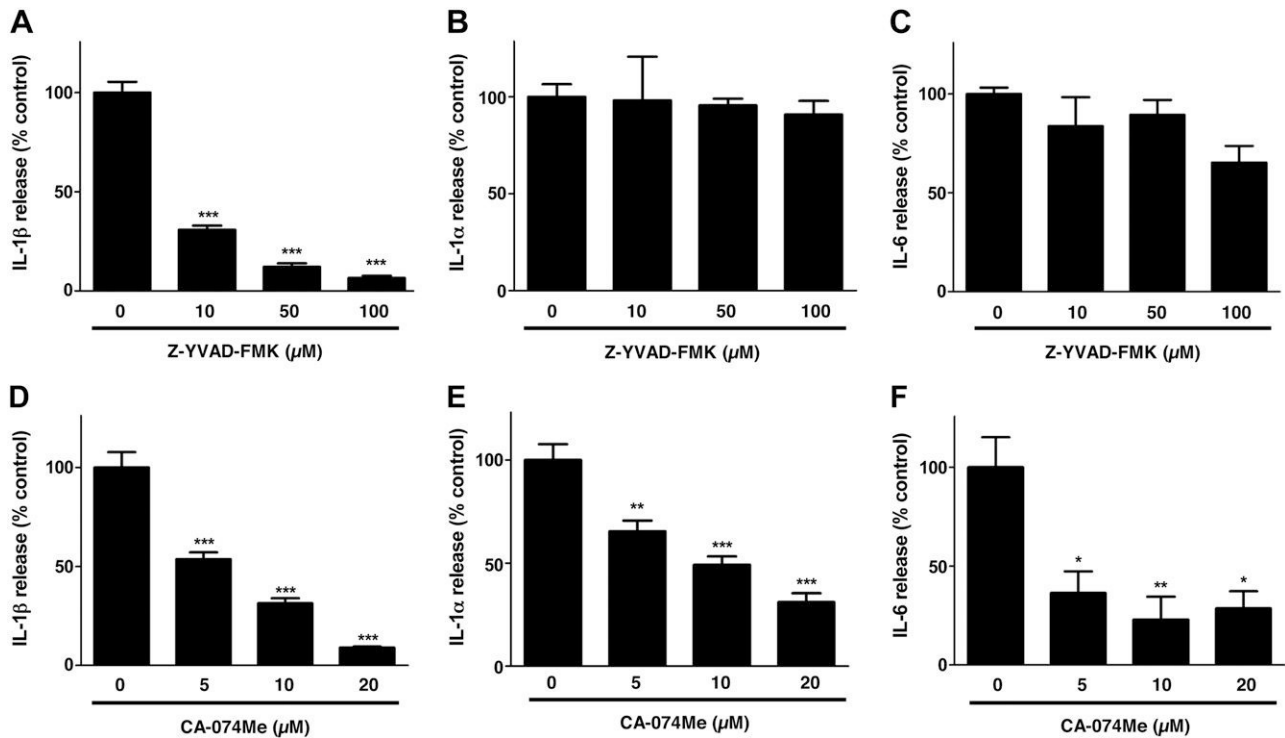
According to data in the literature, MSU induces the production of various inflammatory cytokines (including IL-1 $\beta$  and IL-6) by THP-1 cells and mouse macrophages (5, 6). A dose-response analysis in our experimental model showed that 6 h of incubation with MSU significantly induced the release of IL-1 $\beta$  from MDMs primed

with a low concentration of LPS (0.1  $\mu$ g/ml) (Fig. 1A). Although the production of IL-1 $\alpha$  and IL-6 was induced by MSU in a dose-dependent manner, it was not significantly potentiated by 0.1  $\mu$ g/ml LPS (Fig. 1B, C). These findings indicate that MSU crystals induce the production of inflammatory cytokines by human MDMs and that overnight LPS priming only affects IL-1 $\beta$  release. We next measured the cell viability in MDMs treated with 0, 250, 500, or 1000  $\mu$ g/ml MSU or saponin 0.05% as positive control, primed or not with a low concentration of LPS (0.1  $\mu$ g/ml) for 6 h (Fig. 1D, E). We observed that most of the cells were alive after 6 h of exposure to MSU. However, cells treated by saponin 0.05% have low MTT activity and high LDH release. We also observed that the irreversible caspase 1 inhibitor Z-YVAD-FMK was associated with significantly lower release of IL-1 $\beta$  after cell stimulation by LPS + MSU in a dose-dependent manner (Fig. 2A). In contrast, the release of IL-1 $\alpha$  and IL-6 was not significantly affected by Z-YVAD-FMK in macrophages stimulated with LPS + MSU for 6 h (Fig. 2B, C). Hence, caspase 1 inhibition was associated with low production of IL-1 $\beta$  after MSU stimulation in LPS-primed MDMs but IL-1 $\alpha$  and IL-6 production were unaffected, as previously observed in neonatal hamster kidney cells (27).

Given that cathepsin B appears to be important for NLRP3-inflammasome activation (31), we investigated the mechanism by which lysosomes are destabilized by MSU



**Figure 1.** Effect of combination of LPS and MSU crystals on production of IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , and IL-6 by MDMs. Macrophages were incubated overnight with medium alone (control, white bars) or 0.1  $\mu$ g/ml LPS (black bars), then stimulated with medium alone or with 250, 500, or 1000  $\mu$ g/ml MSU for 6 h. Culture supernatants were collected and concentrations of IL-1 $\beta$  (A), IL-1 $\alpha$  (B), and IL-6 (C) were measured by ELISA. Cytotoxic effects of MSU and/or LPS in MDMs were measured using MTT colorimetric test (D) and LDH release (E). Saponin (0.05%) was used as positive control for LDH release. MTT activity results are expressed as percentage of value found in control cells, arbitrarily set at 100%. Data are presented as means  $\pm$  SEM of representative experiment performed in triplicate (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with control treatment).



**Figure 2.** Effect of caspase 1 inhibitor Z-YVAD-FMK and cathepsin B inhibitor CA-074Me on release of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , and IL-6) from MDMs stimulated with LPS (0.1  $\mu$ g/ml) and MSU (500  $\mu$ g/ml). Macrophages were incubated overnight with 0.1  $\mu$ g/ml LPS and were pretreated with 10, 50, or 100  $\mu$ M Z-YVAD-FMK (A, B, and C, respectively); 5, 10, or 20  $\mu$ M CA-074Me (D, E, and F, respectively); or medium alone for 1 h and then stimulated with 500  $\mu$ g/ml MSU (black bars) for 6 h. Culture supernatants were collected, and concentrations of IL-1 $\beta$  (A, D), IL-1 $\alpha$  (B, E), and IL-6 (C, F) were measured by ELISA. Data are presented as means  $\pm$  SEM of representative experiment performed in triplicate, expressed as percentage of values for LPS + MSU treatment percentage (\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 compared with positive control).

crystals. We observed that the cathepsin B inhibitor CA-074Me was associated with low production of IL-1 $\beta$  (measured by ELISA) in a dose-dependent manner after MSU treatment of LPS-primed MDMs (Fig. 2D). This result confirms cathepsin B's involvement in the release of IL-1 $\beta$  from human macrophages, as previously observed in mouse cells (21). The inhibition of cathepsin B by CA-074Me was also associated with dose-dependent relative decrease in IL-1 $\alpha$  and IL-6 release after 6 h of LPS + MSU treatment (Fig. 2E, F). These results show that cathepsin B and caspase 1 are important for the release of IL-1 $\beta$  by human MDMs, whereas caspase 1 is not involved in the release of IL-1 $\alpha$  and IL-6.

### Expression of components of the inflammasome signaling pathways and proinflammatory cytokines

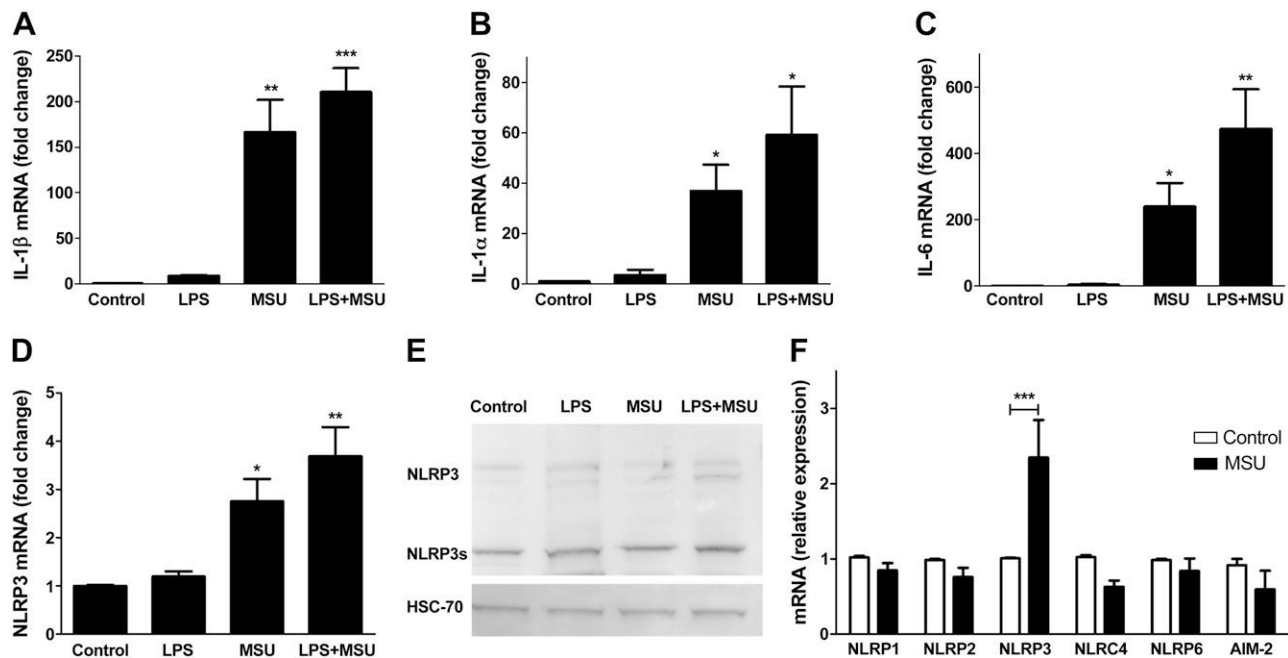
We next examined MSU's effects on proinflammatory gene expression. qPCR analysis revealed elevated mRNA expression of IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , and IL-6 in macrophages after 6 h of treatment with 500  $\mu$ g/ml MSU (whether alone or in combination with LPS) (Fig. 3A–C). We observed that NLRP3 transcript levels are elevated 6 h after treatment of macrophages with MSU (Fig. 3D), as has been previously reported for ATP analogs (28).

Western blot analysis revealed that treatment with 500  $\mu$ g/ml MSU and LPS was associated with significantly greater NLRP3 protein expression in MDMs at 24 h relative

to controls (Fig. 3E). Thus, our data confirm that MSU induces activation of the NLRP3-inflammasome *via* an elevation of NLRP3 and IL-1 $\beta$  mRNA and protein levels in MDMs. Hence, these data suggest that MSU is involved in the priming step and may explain why MSU alone can induce the release of IL-1 $\beta$  (Fig. 1A). However, the expression of other genes in the inflammasome pathway (*e.g.*, NLRP1, NLRP2, NLRC4, NLRP6 and AIM2 [absent in melanoma 2]) was not modified at 6 h (Fig. 3F).

### Effect of MSU on purinergic P2 receptor mRNA and protein levels

We next measured the expression of purinergic receptor mRNA in MDMs from 6 independent donors (Fig. 4A); we observed very strong expression of P2X1R, P2X4R, and P2X7R and moderately strong expression of P2X5R, P2Y2R, and P2Y6R. Moreover, treatment with 500  $\mu$ g/ml MSU was associated with significantly greater P2X7R mRNA expression in MDMs at 6 h, relative to controls (Fig. 4B). A dose-dependent, relative increase in P2X7R mRNA expression after MSU treatment was also seen in THP-1 macrophages (Fig. 4C). Moreover, we also observed by Western blot analysis that the total P2X7R (but not P2X4R) protein expression was increased after 24 h of treatment with 500  $\mu$ g/ml MSU (Fig. 4D). In addition, the amount of P2X7R on the cell surface was also increased as observed by flow cytometry compared with controls (Fig. 4E). These



**Figure 3.** Expression of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , and IL-6) and inflammasomes (NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP4, NLRP6, and AIM-2). MDMs were incubated overnight with medium or 0.1  $\mu$ g/ml LPS and then stimulated with 500  $\mu$ g/ml MSU or medium for 6 h. After collection of cell lysates, IL-1 $\beta$  (A), IL-1 $\alpha$  (B), IL-6 (C), NLRP3 (D), and inflammasome component (NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP4, NLRP6, and AIM-2) (F) mRNA expression was determined by qPCR. Results are normalized against *GAPDH* gene expression. (E) MDMs were incubated overnight with LPS 0.1  $\mu$ g/ml or medium and then stimulated with 500  $\mu$ g/ml MSU or medium for 24 h. Cell lysates were collected, and expression of full-length NLRP3 and short NLRP3 (NLRP3s) was assessed by immunoblotting. Blot shown is representative of 3 similar experiments. HSC-70 was used to show equal loading in each lane. Data are presented as means  $\pm$  SEM of representative experiment performed in triplicate (\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 compared with control treatment).

results are consistent with previous data reporting the involvement of P2X7R in IL-1 $\beta$  release (23). In contrast, P2X1R, P2X4R, P2Y2R, or P2Y6R mRNA and P2X4R protein expressions were not significantly elevated after MSU treatment compared with controls, although the cell surface expression of P2X4R was slightly increased after MSU treatment (Fig. 4B–E).

The present experiments are the first to show the induction of P2X7R expression after MSU treatment. Taken as a whole, these results show that only the P2X7R purinergic receptor seems to be significantly involved in MDM activation after MSU stimulation [as observed after ATP stimulation (28, 32)].

#### Analysis of the cleavage of pro-IL-1 $\beta$ after combined treatment with LPS and MSU

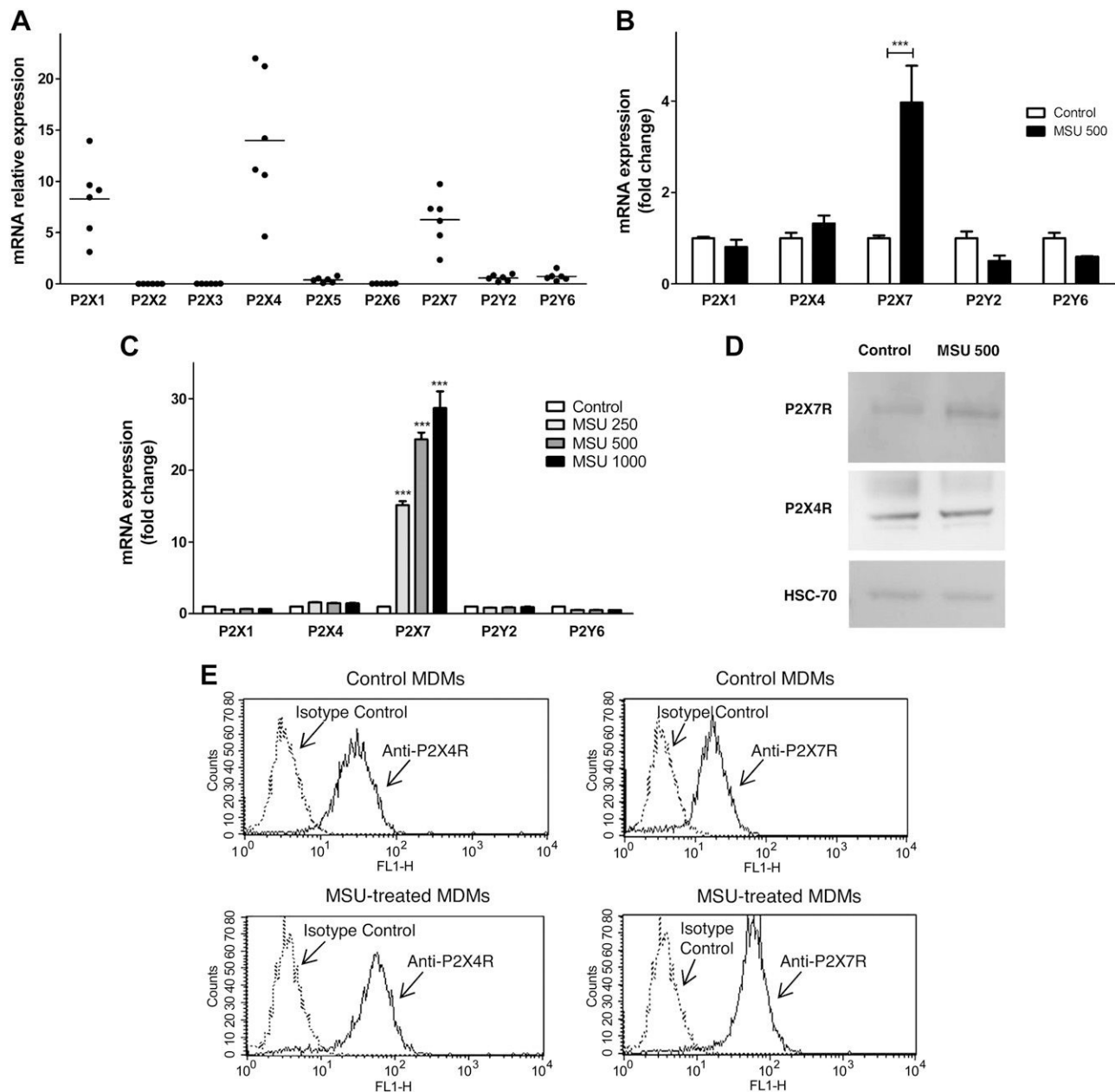
To investigate the possible involvement of caspase 1 and P2X7R in pro-IL-1 $\beta$  cleavage after MSU treatment, we used Z-YVAD-FMK and the selective P2X7R antagonist A-740003. Western blotting analysis revealed that the 35 kDa form of pro-IL-1 $\beta$  was present in cell lysates after an overnight treatment with LPS (0.1  $\mu$ g/ml) (Fig. 5A). After treatment of MDMs with MSU (250, 500, and 1000  $\mu$ g/ml), the expression of pro-IL-1 $\beta$  was reduced in a dose-dependent manner. Treatment with Z-YVAD-FMK (100  $\mu$ M) partially prevented the relative reduction in pro-IL-1 $\beta$  expression after LPS + MSU treatment. As expected, IL-1 $\beta$  (17 kDa) was not detected in cell lysates,

as has already been reported for a mouse macrophage model (33). These data suggest that in LPS-primed human macrophages, MSU treatment induces the release of IL-1 $\beta$  (Fig. 1A) *via* the maturation of pro-IL-1 $\beta$  in a caspase 1-mediated pathway. To determine whether the cleavage of pro-IL-1 $\beta$  induced by MSU was mediated by the P2X7R, human macrophages were incubated with 100  $\mu$ M of A-740003; this treatment prevented the reduction in pro-IL-1 $\beta$  cleavage induced by incubation with LPS + MSU (Fig. 5A).

#### Involvement of purinergic receptors in IL-1 $\beta$ production

To confirm P2X7R's role in IL-1 $\beta$  release, we pretreated MDMs with A-740003, incubated the cells overnight with LPS or medium, and then stimulated them with MSU or medium. We observed that the relative increase in IL-1 $\beta$  release induced by LPS + MSU treatment was significantly inhibited by treatment with A-740003 (Fig. 5B). Thus, our results demonstrate that P2X7R has a role in pro-IL-1 $\beta$  cleavage and IL-1 $\beta$  secretion in MDMs treated with LPS + MSU.

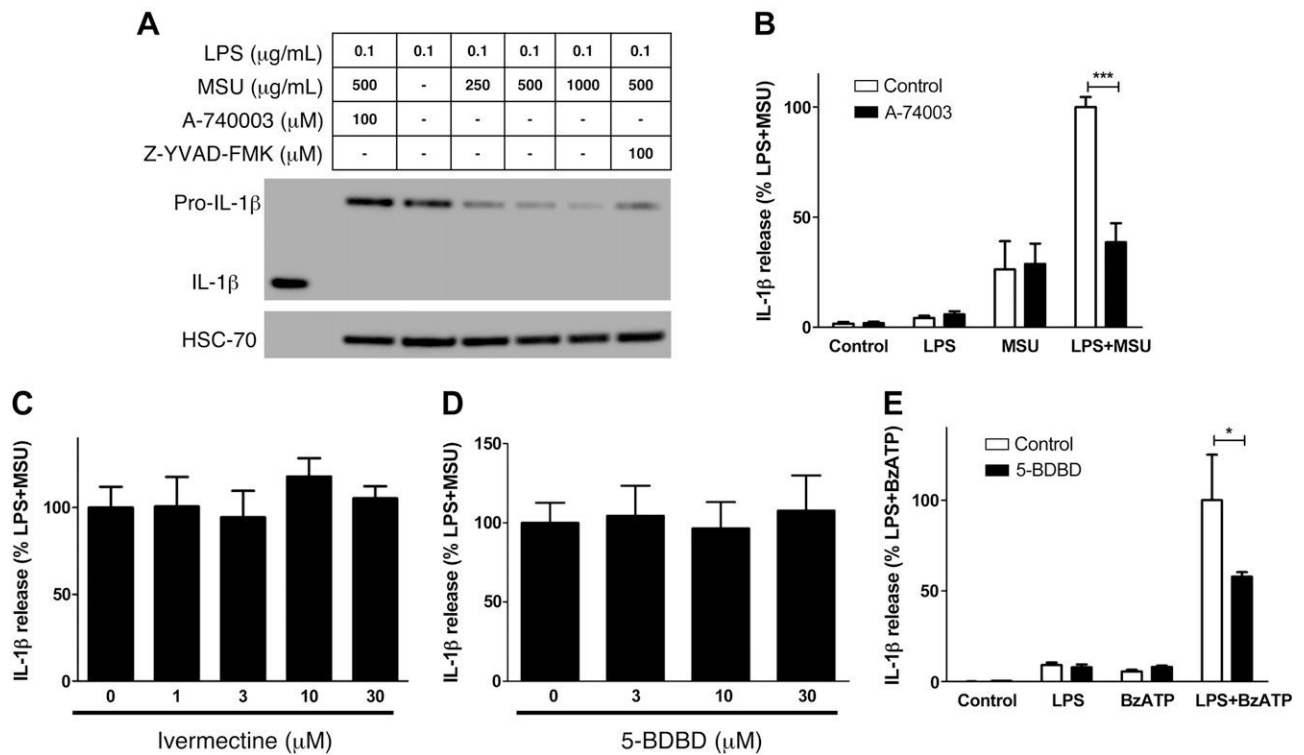
P2X4R and P2X7R subunits are likely to interact and form heterotrimers (24, 34, 35). It has also been shown that P2X4R is involved in IL-1 $\beta$  release in macrophages (24, 36). We therefore sought to establish whether P2X4R contributes to the inflammatory response after LPS + MSU treatment. Incubating MDMs with ivermectin (a positive



**Figure 4.** Expression of purinergic P2 receptors on human macrophages. *A*) MDMs were obtained by incubating monocytes (from 6 different donors) with rhGM-CSF (50 ng/ml) in medium. After 8 d, cell lysates were collected and gene expression of purinergic receptors (P2X1R, P2X2R, P2X3R, P2X4R, P2X5R, P2X6R, P2X7R, P2Y2R, and P2Y6R) was determined by qPCR. Mean expression of each receptor gene was normalized against that of GAPDH gene. *B*) Treatment with MSU induces expression of P2X7R mRNA in human macrophages, as measured by qPCR. MDMs were stimulated with 500  $\mu$ g/ml MSU (black bars) or medium alone (white bars, control) for 6 h. *C*) PMA-differentiated THP-1 cells were stimulated with medium or 250, 500, or 1000  $\mu$ g/ml MSU for 6 h. Cell lysates were collected, and expression of mRNA purinergic receptors (P2X1R, P2X4R, P2X7R, P2Y2R, and P2Y6R) was determined by qPCR. Expression of each receptor gene was normalized against that of *GAPDH* gene. Values correspond to mean  $\pm$  SEM from at least 3 independent experiments ( $***P < 0.001$  compared with control treatment). *D*) MDMs were stimulated with medium or 500  $\mu$ g/ml MSU for 24 h. Total cell lysates were collected, and P2X7R and P2X4R expressions were assessed by immunoblotting. Blot shown is representative of 3 similar experiments; HSC-70 was used to show equal total protein loading in each lane. *E*) Expressions of P2X4R and P2X7R on cell surface were studied by indirect immunofluorescence and flow cytometry detection in control cells and MDMs stimulated with 500  $\mu$ g/ml MSU for 24 h. Baseline fluorescence of MDMs is shown by isotype control (dotted lines), and specific P2X4R and P2X7R fluorescence is shown by anti-P2X4R and anti-P2X7R histograms (solid lines).

allosteric modulator of P2X4R) or 5-BDBD (a selective P2X4R antagonist) did not significantly affect IL-1 $\beta$  release in response to LPS + MSU (Fig. 5C, D), suggesting that P2X4R is not involved in the release of IL-1 $\beta$  from human

macrophages after MSU treatment. However, we observed that 5-BDBD was associated with significantly lower release of IL-1 $\beta$  after cell stimulation by LPS + BzATP (Fig. 5E). To further investigate the involvement of purinergic receptors



**Figure 5.** P2X7R antagonist (A-740003) and caspase 1 inhibitor (Z-YVAD-FMK) reduce cleavage of pro-IL-1 $\beta$  after LPS + MSU treatment of MDMs, according to immunoblot analysis. *A*) MDMs were incubated overnight with LPS 0.1  $\mu$ g/ml, pretreated with 100  $\mu$ M A-740003, 100  $\mu$ M Z-YVAD-FMK, or medium for 1 h, and then stimulated with 250, 500, or 1000  $\mu$ g/ml MSU or medium for 6 h. Cell lysates were collected, and pro-IL-1 $\beta$  expression was assessed by immunoblotting. Positive control (recombinant human IL-1 $\beta$ ) showed 17 kDa IL-1 $\beta$  form. Blot shown is representative of 3 similar experiments. *B*) MDMs were incubated overnight with 0.1  $\mu$ g/ml LPS or medium, pretreated with 100  $\mu$ M A-740003 (black bars) or medium (white bars) for 1 h, and then stimulated with 500  $\mu$ g/ml MSU or medium for 6 h. MDMs were incubated overnight with 0.1  $\mu$ g/ml LPS or medium, pretreated with medium or 1, 3, 10, or 30  $\mu$ M ivermectin (a positive allosteric modulator of P2X4R) (*C*) or 3, 10, or 30  $\mu$ M 5-BDBD (a P2X4R antagonist) (*D*) for 1 h and then stimulated with 500  $\mu$ g/ml MSU (black bars) for 6 h. *E*) MDMs were incubated overnight with 0.1  $\mu$ g/ml LPS or medium, pretreated with 10  $\mu$ M 5-BDBD (black bars) or medium (white bars) for 1 h, and then stimulated with 500  $\mu$ M BzATP or medium for 6 h. Culture supernatants were collected, and IL-1 $\beta$  release was measured by ELISA. Values correspond to means  $\pm$  SEM from 3 independent experiments, expressed as percentage of value for LPS + MSU treatment (\* $P$  < 0.05, \*\*\* $P$  < 0.001 compared with positive control).

in IL-1 $\beta$  production, we transfected cells with siRNAs against P2X4R and P2X7R or a nontargeting (mock) siRNA. Silencing of purinergic receptor expression peaked between 48 and 72 h. Hence, electroporation after 6 d of culture was technically compatible with our protocol of LPS priming on d 7 and 6 h of MSU treatment on d 8 (*i.e.*, 54 h after siRNA transfection). Electroporation of siRNAs against P2X4R and P2X7R led to the specific, significant knockdown of mRNA levels (**Fig. 6A–C**) and protein expression (**Fig 6D, E**) in macrophages at 54 h. Silencing affected only the purinergic receptor being targeted because the expression of the other receptors was not affected by this specific siRNA (data not shown).

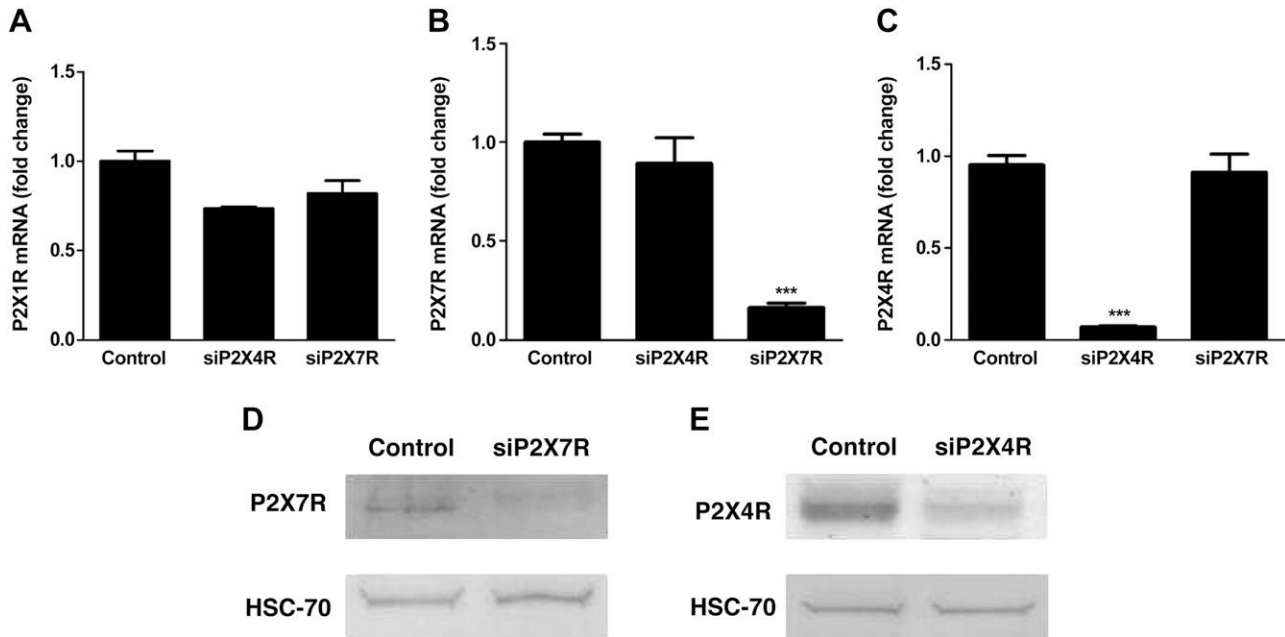
As expected, we found that our rhGM-CSF-differentiated MDM model was able to secrete a panel of classically activated M1 macrophage cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-23, CCL [chemokine (C-C motif) ligand] 4, and CCL2) after LPS + MSU stimulation (**Fig. 7A**). In contrast, M2 macrophage cytokines (IL-5, IL-10, IL-13, and IL-4) are poorly produced. Furthermore, we found that the production of M1 macrophage cytokines after LPS + MSU treatment is lower in macrophages transfected with siP2X7R than in macrophages transfected with control

siRNA or siP2X4R (**Fig. 7A**). In particular, levels of IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  release were significantly lower (**Fig. 7B–E**). In contrast, levels of M2 cytokines were elevated after siP2X7R transfection. The low observed M1 macrophage cytokines production after siP2X7R transfection supports the hypothesis whereby P2X7R is the proinflammatory receptor that drives the MSU-mediated activation of human macrophages.

## DISCUSSION

Our present results show that MSU-induced IL-1 $\beta$  production in LPS-primed MDMs mainly involves activation of purinergic P2 receptors and the NLRP3-inflammasome pathway, including caspase 1 activation and cathepsin B.

The NLRP3-inflammasome pathway is known to be involved in many inflammatory diseases. MSU is a potent danger signal; it activates the NLRP3-inflammasome pathway through mechanisms involving ATP release and autocrine purinergic signaling (21, 37). Here, we found that MSU crystals induce IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , and IL-6 mRNA expression and protein release in LPS-primed MDMs.



**Figure 6.** siRNA electroporation extinguishes purinergic receptor expression at 54 h. MDMs were transfected by electroporation at d 6 with siRNA targeting P2X4R or P2X7R or with nontargeting (mock) siRNA. Cell lysates were collected 54 h after electroporation. Expression of P2X1R (A), P2X4R (B), and P2X7R (C) mRNA expression was measured by qPCR, and P2X7R (D) and P2X4R (E) protein expression was measured using immunoblotting experiments. HSC-70 was used as loading control. Values correspond to means  $\pm$  SEM from 3 independent experiments. Results were normalized against expression of *GAPDH* gene (\*\*\*)  $P < 0.001$  compared with control).

Even though MSU treatment increase the release of IL-1 $\beta$ , priming with LPS was required for marked gene expression and protein release. These results confirmed that human macrophages require 2 independent stimuli for activation of the NLRP3-inflammasome: an initial TLR-dependent stimulus enabling the transcription and translation of pro-IL-1 $\beta$ , followed by a second stimulus (such as MSU) for activation of posttranslational, caspase 1-dependent, pro-IL-1 $\beta$  cleavage (12).

Given that NLRP3 expression is strongly induced by a variety of stimuli (1), we looked at whether other inflammasome pathways (NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRC4, NLRP6, and AIM2) were activated by MSU in MDMs. Only NLRP3 expression was induced, and this induction was even greater in LPS-primed MDMs than in nonprimed MDMs (Fig. 3D, E). This is consistent with our previous study using BzATP, a nonhydrolysable ATP agonist of purinergic receptors (28).

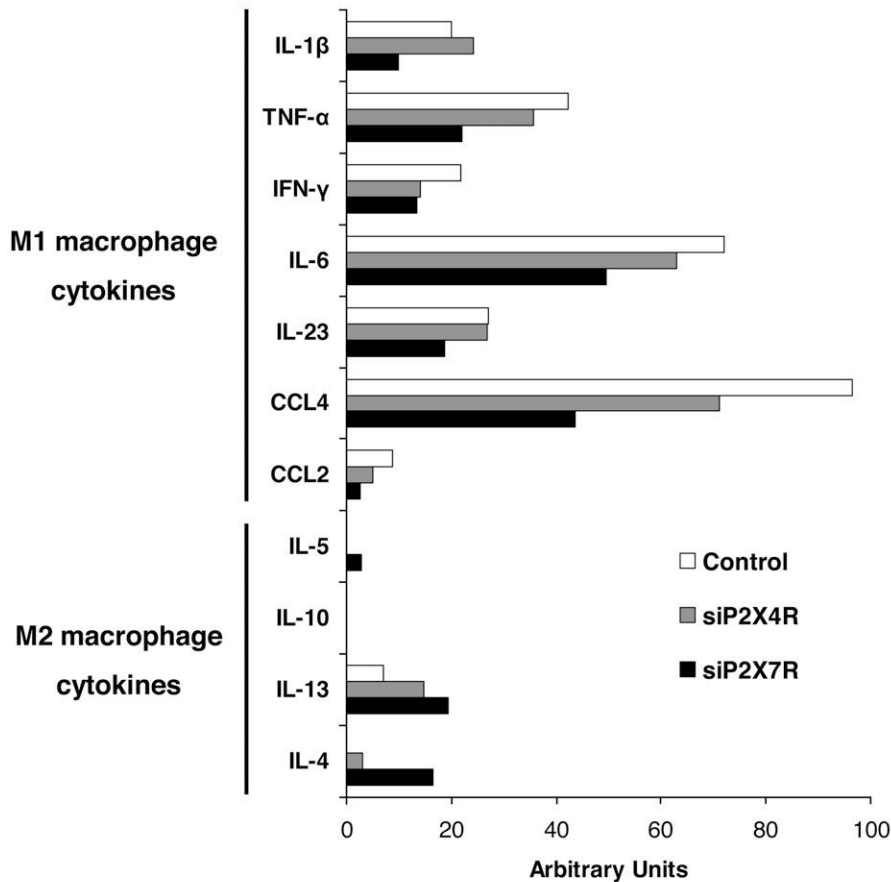
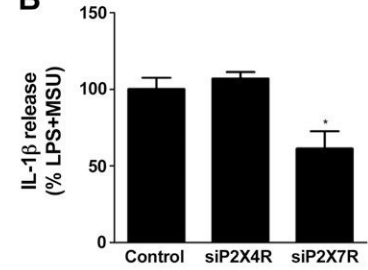
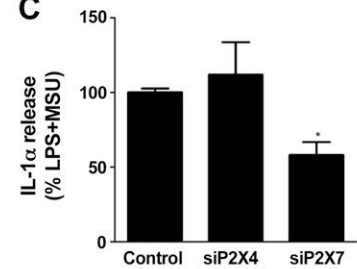
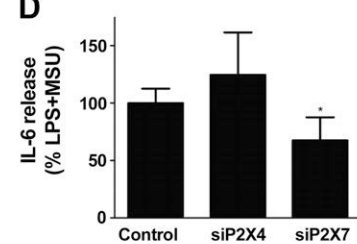
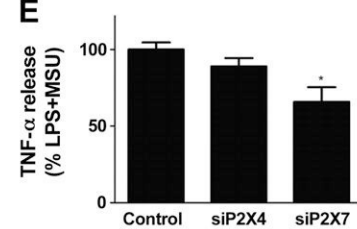
Many crystalline compounds have been shown to induce lysosome destabilization and rupture, followed by the release of cathepsin B into the cytosol and activation of the NLRP3-inflammasome (18, 38). Our present results show that IL-1 $\beta$  release depends on both caspase 1 and cathepsin B, in agreement with the report of Riteau *et al.* (21) of IL-1 $\beta$  release by bone marrow-derived macrophages from cathepsin B, NLRP3, or caspase 1 knockout mice after treatment with LPS + MSU. Treatment with CA-074Me was associated with a relative reduction in the release of IL-1 $\alpha$  and IL-6 induced by LPS + MSU in a dose-dependent manner, showing that the proinflammatory signal induced by MSU is mediated by cathepsin B. In contrast, caspase 1 inhibition did not affect IL-1 $\alpha$  and IL-6 release. Some studies in the literature have suggested that IL-1 $\alpha$  release is regulated by the NLRP3-inflammasome (39, 40). In contrast,

our present results are consistent with a previous report in which the ATP analogs BzATP and ATP- $\gamma$ S (both NLRP3-inflammasome activators) potentiated the release of IL-1 $\beta$  (but not IL-1 $\alpha$  and IL-6) induced by a low concentration of LPS (28). Thus, our present results indicate that IL-1 $\alpha$  secretion in primary human macrophages is independent of caspase 1.

In mice, peripheral myeloid cells are known to express a variety of purinergic receptor subtypes (41, 42). However, purinergic receptor expression in humans has not been well characterized. Here, we found that although human MDMs express the genes for P2X5R, P2Y2R, and P2Y6R to some extent, the genes for P2X1R, P2X4R, and P2X7R are expressed even more strongly. It has been widely reported that P2X7R is involved in inflammatory processes (5, 43) by promoting the maturation and release of proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  in monocytes, macrophages (33, 44), and lymphocytes (45). P2X7R has a well-known ATP-dependent IL-1 $\beta$  secretion (46). However, the mechanism underlying the release of proinflammatory cytokines *via* activation of P2X7R and NLRP3-inflammasome has not been definitively identified in previous studies. Here, we clearly demonstrated P2X7R's involvement in MSU-induced IL-1 $\beta$  production by macrophages (differentiated THP-1 cells and MDMs).

We further investigated the effects of the selective, competitive P2X7R antagonist A-740003 on the release of cytokines by macrophages. Treatment with A-740003 was associated with lower IL-1 $\beta$  release and lower pro-IL-1 $\beta$  cleavage after stimulation of macrophages with LPS and MSU. These results are consistent with previous reports of activation by ATP analogs in LPS-primed, MSU-stimulated bone marrow-derived macrophages (21).



**A****B****C****D****E**

**Figure 7.** A) Cytokine concentrations in supernatant were measured with cytokine protein array. Data shown are from 1 representative experiment performed in triplicate. At d 7, macrophages (with control siRNA, siP2X4R, and siP2X7R) were incubated overnight with 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS and then stimulated with 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  MSU for 6 h. Culture supernatants were collected and concentrations of IL-1 $\beta$  (B), IL-1 $\alpha$  (C), IL-6 (D), and TNF- $\alpha$  (E) were measured by ELISA. Data are expressed as means  $\pm$  SEM from 3 independent experiments as percentage of value for LPS + MSU treatment (\* $P < 0.05$  compared with positive control).

We also investigated the functional role of purinergic P2 receptors in activation of the NLRP3-inflammasome pathway after MSU treatment of human macrophages. P2X4R and P2X7R expression was extinguished by specific siRNA. Importantly, we found that the specific extinction of purinergic receptor expression by siRNA did not affect other receptors. Furthermore, the mRNA expression of P2X4 did not rise in the presence of siP2X7R, and *vice versa*, even though the respective receptors' subunits are known bind to each other (24, 35, 47).

Ivermectin has been described as a positive allosteric modulator of P2X4R and increases the receptor's affinity for ATP (48). We found here that in the presence of ivermectin or the P2X4R antagonist 5-BDBD, treatment with LPS + MSU did not modify the release of IL-1 $\beta$ , whereas blockade of P2X4R reduced the production of IL-1 $\beta$  after LPS + BzATP treatment by MDMs. Seil *et al.* (24) showed that the combination of ATP and ivermectin is associated

with an abnormally low intracellular potassium concentration and promotes IL-1 $\beta$  secretion. Our findings confirm the involvement of P2X4R in the secretion of IL-1 $\beta$  by ATP analog-stimulated macrophages. The purinergic P2X4 receptor has been implicated in the release of IL-1 $\beta$  after biglycan or high glucose treatment (49, 50). However, we found that incubation with ivermectin, 5-BDBD, or siRNA against P2X4R did not affect IL-1 $\beta$  production by MSU-stimulated human macrophages. Hence, P2X4 receptors are not probably involved in the IL-1 $\beta$  secretion after LPS + MSU treatment.

Conventionally, there are 2 pathways for macrophage activation: the classic M1 pathway and the alternative M2 pathways. M1 stimuli (such as LPS and GM-CSF) induce a prototypic inflammatory response, whereas M2 stimuli antagonize this response (51). Using a protein microarray, we observed that our rhGM-CSF-differentiated macrophages model released M1 macrophage cytokines after

LPS + MSU treatment. We were also interested to see whether the production of other cytokines was dependent on the activation of P2X4R and P2X7R. We observed that the blockade of P2X7R reduced the production of not only IL-1 $\beta$  but also other M1 macrophage cytokines (such as IL-1 $\alpha$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ ), suggesting that P2X7R is a proinflammatory receptor on human macrophages.

In conclusion, our results demonstrated the involvement of purinergic receptors and the NLRP3-inflammasome pathway in the secretion of IL-1 $\beta$  by MSU-stimulated human macrophages. Our findings confirmed the quantitative difference between NLRP3-inflammasome activation by MSU crystals and activation by exogenous ATP, and suggested that blockade of the NLRP3-inflammasome pathway or the purinergic P2X7R is a novel potential therapeutic approach to control the inflammatory process in several associated pathologies. **[F]**

This study was funded by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR2010 MIDI01202) and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. The authors thank A. Sharanek and F. Rassendren (Institut of Functional Genomic, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5203 and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 661, Université de Montpellier, Montpellier, France) for their helpful contributions and the Biogenouest SynNanoVect facility (IBiSA; ISO 9001) for technical assistance with the electroporation experiments.

## REFERENCES

- Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B. G., Fitzgerald, K. A., Hornung, V., and Latz, E. (2009) Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* **183**, 787–791
- Villani, A. C., Lemire, M., Fortin, G., Louis, E., Silverberg, M. S., Collette, C., Baba, N., Libioulle, C., Belaiche, J., Bitton, A., Gaudet, D., Cohen, A., Langelier, D., Fortin, P. R., Wither, J. E., Sarfati, M., Rutgeerts, P., Rioux, J. D., Vermeire, S., Hudson, T. J., and Franchimont, D. (2009) Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* **41**, 71–76
- Rosengren, S., Hoffman, H. M., Bugbee, W., and Boyle, D. L. (2005) Expression and regulation of cryopyrin and related proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Ann. Rheum. Dis.* **64**, 708–714
- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M. F., Hawkins, P. N., and Tschopp, J. (2004) NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells auto-inflammatory disorder. *Immunity* **20**, 319–325
- Riteau, N., Gasse, P., Fauconnier, L., Gombault, A., Couegnat, M., Fick, L., Kanellopoulos, J., Quesniaux, V. F., Marchand-Adam, S., Crestani, B., Ryffel, B., and Couillin, I. (2010) Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 774–783
- Gasse, P., Riteau, N., Charron, S., Girre, S., Fick, L., Pétrilli, V., Tschopp, J., Lagente, V., Quesniaux, V. F., Ryffel, B., and Couillin, I. (2009) Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 903–913
- Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J. (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237–241
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* **10**, 417–426
- Kahlenberg, J. M., and Dubyak, G. R. (2004) Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K<sup>+</sup> release. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **286**, C1100–C1108

- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M., and Dixit, V. M. (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228–232
- Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* **14**, 1583–1589
- Kanneganti, T. D., Lamkanfi, M., Kim, Y. G., Chen, G., Park, J. H., Franchi, L., Vandenabeele, P., and Núñez, G. (2007) Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* **26**, 433–443
- Shi, Y., Evans, J. E., and Rock, K. L. (2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* **425**, 516–521
- Liu-Bryan, R., Scott, P., Sydlaske, A., Rose, D. M., and Terkeltaub, R. (2005) Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum.* **52**, 2936–2946
- Scott, P., Ma, H., Viriyakosol, S., Terkeltaub, R., and Liu-Bryan, R. (2006) Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals. *J. Immunol.* **177**, 6370–6378
- Chen, C. J., Shi, Y., Hearn, A., Fitzgerald, K., Golenbock, D., Reed, G., Akira, S., and Rock, K. L. (2006) MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J. Clin. Invest.* **116**, 2262–2271
- Wu, J., Yan, Z., Schwartz, D. E., Yu, J., Malik, A. B., and Hu, G. (2013) Activation of NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury. *J. Immunol.* **190**, 3590–3599
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A., and Latz, E. (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* **9**, 847–856
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., Stewart, C. R., Monks, B. G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K. A., Latz, E., Moore, K. J., and Golenbock, D. T. (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.* **9**, 857–865
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., Abela, G. S., Franchi, L., Núñez, G., Schnurr, M., Espevik, T., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Rock, K. L., Moore, K. J., Wright, S. D., Hornung, V., and Latz, E. (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357–1361
- Riteau, N., Baron, L., Villeret, B., Guillou, N., Savigny, F., Ryffel, B., Rassendren, F., Le Bert, M., Gombault, A., and Couillin, I. (2012) ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis.* **3**, e403
- Tao, J. H., Zhang, Y., and Li, X. P. (2013) P2X7R: a potential key regulator of acute gouty arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* **43**, 376–380
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R. M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., and Di Virgilio, F. (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* **176**, 3877–3883
- Seil, M., El Oualiti, M., Fontanils, U., Etxebarria, I. G., Pochet, S., Dal Moro, G., Marino, A., and Dehaye, J. P. (2010) Ivermectin-dependent release of IL-1beta in response to ATP by peritoneal macrophages from P2X(7)-KO mice. *Purinergic Signal.* **6**, 405–416
- De Rivero Vaccari, J. P., Bastien, D., Yurcisin, G., Pineau, I., Dietrich, W. D., De Koninck, Y., Keane, R. W., and Lacroix, S. (2012) P2X4 receptors influence inflammasome activation after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **32**, 3058–3066
- Baron, L., Gombault, A., Manoussa, F., Villeret, B., Savigny, F., Guillou, N., Lagente, V., Rassendren, F., Riteau, N., and Couillin, I. The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. *Cell Death Dis.* (2015) **6**:e1629.
- Uratsuji, H., Tada, Y., Kawashima, T., Kamata, M., Hau, C. S., Asano, Y., Sugaya, M., Kadono, T., Asahina, A., Sato, S., and Tamaki, K. (2012) P2Y6 receptor signaling pathway mediates inflammatory responses induced by monosodium urate crystals. *J. Immunol.* **188**, 436–444
- Gicquel, T., Victoni, T., Fautrel, A., Robert, S., Gleonnec, F., Guezingar, M., Couillin, I., Catros, V., Boichot, E., and Lagente, V. (2014) Involvement of purinergic receptors and NOD-like

- receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **41**, 279–286
29. Laurent, V., Fraix, A., Montier, T., Cammas-Marion, S., Ribault, C., Benvegna, T., Jaffres, P.-A., and Loyer, P. (2010) Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like cells: new means for drug metabolism and toxicity studies. *Biotechnol. J.* **5**, 314–320
  30. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**, 402–408
  31. Schotte, P., Schauvliege, R., Janssens, S., and Beyaert, R. (2001) The cathepsin B inhibitor z-FA.fmk inhibits cytokine production in macrophages stimulated by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **276**, 21153–21157
  32. Ward, J. R., West, P. W., Ariaans, M. P., Parker, L. C., Francis, S. E., Crossman, D. C., Sabroe, I., and Wilson, H. L. (2010) Temporal interleukin-1beta secretion from primary human peripheral blood monocytes by P2X7-independent and P2X7-dependent mechanisms. *J. Biol. Chem.* **285**, 23147–23158
  33. Pelegrin, P., Barroso-Gutierrez, C., and Surprenant, A. (2008) P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *J. Immunol.* **180**, 7147–7157
  34. Guo, C., Masin, M., Qureshi, O. S., and Murrell-Lagnado, R. D. (2007) Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol. Pharmacol.* **72**, 1447–1456
  35. Casas-Pruneda, G., Reyes, J. P., Pérez-Flores, G., Pérez-Cornejo, P., and Arreola, J. (2009) Functional interactions between P2X4 and P2X7 receptors from mouse salivary epithelia. *J. Physiol.* **587**, 2887–2901
  36. Hung, S. C., Choi, C. H., Said-Sadier, N., Johnson, L., Atanasova, K. R., Sellami, H., Yilmaz, Ö., and Ojcius, D. M. (2013) P2X4 assembles with P2X7 and pannexin-1 in gingival epithelial cells and modulates ATP-induced reactive oxygen species production and inflammasome activation. *PLoS ONE* **8**, e70210
  37. Gombault, A., Baron, L., and Couillin, I. (2012) ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front. Immunol.* **3**, 414
  38. Dostert, C., Pétrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., and Tschopp, J. (2008) Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* **320**, 674–677
  39. Gross, O., Yazdi, A. S., Thomas, C. J., Masin, M., Heinz, L. X., Guarda, G., Quadroni, M., Drexler, S. K., and Tschopp, J. (2012) Inflammasome activators induce interleukin-1alpha secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity* **36**, 388–400
  40. Fettelschoss, A., Kistowska, M., LeibundGut-Landmann, S., Beer, H. D., Johansen, P., Senti, G., Contassot, E., Bachmann, M. F., French, L. E., Oxenius, A., and Kündig, T. M. (2011) Inflammasome activation and IL-1beta target IL-1alpha for secretion as opposed to surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 18055–18060
  41. Brône, B., Moechars, D., Marrannes, R., Mercken, M., and Meert, T. (2007) P2X currents in peritoneal macrophages of wild type and P2X4-/- mice. *Immunol. Lett.* **113**, 83–89.
  42. Sim, J. A., Park, C. K., Oh, S. B., Evans, R. J., and North, R. A. (2007) P2X1 and P2X4 receptor currents in mouse macrophages. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 1283–1290
  43. Chessell, I. P., Hatcher, J. P., Bountra, C., Michel, A. D., Hughes, J. P., Green, P., Egerton, J., Murfin, M., Richardson, J., Peck, W. L., Grahames, C. B., Casula, M. A., Yiangou, Y., Birch, R., Anand, P., and Buell, G. N. (2005) Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* **114**, 386–396
  44. Pelegrin, P., and Surprenant, A. (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* **25**, 5071–5082
  45. Eleftheriadis, T., Pissas, G., Karioti, A., Antoniadis, G., Golfopoulos, S., Liakopoulos, V., Mamara, A., Speletas, M., Koukoulis, G., and Stefanidis, I. (2013) Uric acid induces caspase-1 activation, IL-1beta secretion and P2X7 receptor dependent proliferation in primary human lymphocytes. *Hypokratia* **17**, 141–145
  46. Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., Griffiths, R. J., and Gabel, C. A. (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 125–132
  47. Nicke, A. (2008) Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**, 803–808
  48. Priel, A., and Silberberg, S. D. (2004) Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *J. Gen. Physiol.* **123**, 281–293
  49. Babelova, A., Moreth, K., Tsalastra-Greul, W., Zeng-Brouwers, J., Eickelberg, O., Young, M. F., Bruckner, P., Pfeilschifter, J., Schaefer, R. M., Gröne, H. J., and Schaefer, L. (2009) Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via Toll-like and P2X receptors. *J. Biol. Chem.* **284**, 24035–24048
  50. Chen, K., Zhang, J., Zhang, W., Zhang, J., Yang, J., Li, K., and He, Y. (2013) ATP-P2X4 signaling mediates NLRP3 inflammasome activation: a novel pathway of diabetic nephropathy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 932–943
  51. Martinez, F. O., and Gordon, S. (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **6**, 13

Received for publication December 17, 2014.

Accepted for publication June 15, 2015.



## Résumé :

La voie de signalisation de l'inflammasome est impliquée dans plusieurs pathologies inflammatoires dont la fibrose pulmonaire et plus récemment, elle a été mise en lumière dans le développement de la fibrose hépatique. L'activation de ce complexe permet la maturation et la libération de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  par les cellules immunitaires telles les macrophages, après reconnaissance de motifs bactériens ou de signaux de danger. L'objectif de cette thèse était de montrer les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquelles l'inflammasome est impliqué dans la fibrose hépatique. Par une première approche avec un hépatotoxique, le CCl<sub>4</sub>, chez la souris, nous avons observé que nos stratégies bloquantes de la signalisation de l'inflammasome ne permettent pas de faire le lien direct avec le développement de la fibrogénèse. Dans une seconde approche *in vitro*, nous avons montré que les fibroblastes hépatiques répondent à des médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-8 par un déséquilibre de la balance MMP/TIMP favorable à la fibrolyse, une exacerbation de la réponse inflammatoire et la diminution de l'expression d'un marqueur d'activation des fibroblastes, l' $\alpha$ -SMA. Enfin, la mise en co-culture de ces fibroblastes avec différents macrophages a montré des effets similaires après activation de l'inflammasome par le LPS et les cristaux de MSU dans les cellules immunitaires, suggérant ainsi un rôle indirect de l'activation de l'inflammasome sur la réponse des fibroblastes hépatiques activés.

**Mots clés :** Inflammasome, fibrose hépatique, cytokine, macrophage, fibroblaste, inflammation, fibrolyse.

## Summary:

Inflammasome pathway is implicated in several inflammatory diseases such as pulmonary fibrosis. Nowadays, several data exist and suggest the implication of this pathway in liver fibrosis development. Once activated, the inflammasome pathway leads to the production and the release of IL-1 $\beta$ , a pro-inflammatory cytokine, by immune cells such as macrophages. The aim of this thesis was to describe the molecular and the cellular mechanism underlining the implication of the inflammasome pathway in liver fibrosis development. To assess this hypothesis, we have firstly inhibited inflammasome pathway in CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity mouse model. However, this approach did not clearly establish the implication of this pathway in liver fibrosis development. Thus in a second part, we have used an *in vitro* approach and demonstrate that liver fibroblasts response to pro-inflammatory mediators such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-8, and lead to a change in MMP/TIMP balance. The changes conduce to fibrolysis, an exacerbation of the inflammatory response and the decrease in the expression of  $\alpha$ -SMA, an activation marker of fibroblasts.

Finally, by co-culturing the fibroblasts with different macrophages, we showed similar effects after inflammasome activation by LPS and the MSU crystals in immune cells, suggesting an indirect role of the activation of inflammasome on the response of activated liver fibroblasts.

**Key words:** Inflammasome, liver fibrosis, cytokine, macrophage, fibroblast, inflammation, fibrolysis