



**HAL**  
open science

# Régulation des fonctions des myofibroblastes portaux par le stress du réticulum endoplasmique

Emilien Loeuillard

► **To cite this version:**

Emilien Loeuillard. Régulation des fonctions des myofibroblastes portaux par le stress du réticulum endoplasmique. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066071 . tel-02022475v1

**HAL Id: tel-02022475**

**<https://theses.hal.science/tel-02022475v1>**

Submitted on 18 Feb 2019 (v1), last revised 24 Sep 2019 (v2)

**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.

# THESE de DOCTORAT

de

l'Université Pierre et Marie Curie

*Ecole doctorale 394 Physiologie et Physiopathologie*

*Inserm UMR\_S 938, Centre de Recherche Saint Antoine (CRSA), Equipe : Maladies fibro-inflammatoires du foie d'origine métabolique et biliaire. Pr. Chantal Housset*

Présentée par

**Emilien LOEUILLARD**

## **Régulation des fonctions des myofibroblastes portaux par le stress du réticulum endoplasmique**

soutenue le 16 février 2017

Devant un jury composé de :

Pr Jean-Sébastien Hulot	Président
Dr Eric Chevet	Rapporteur
Dr Fatima Teixeira-Clerc	Rapporteur
Dr Thierry Tordjmann	Examineur
Pr Chantal Housset	Directeur de thèse
Dr Axelle Cadoret	Co-directeur de thèse

## Remerciements

J'adresse mes remerciements au Professeur Jean-Sébastien Hulot pour avoir accepté de présider ce jury, et au Docteur Fatima Clerc d'avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit.

Je tenais à remercier particulièrement le Docteur Eric Chevet et le Docteur Thierry Tordjman d'avoir accepté d'être rapporteur et examinateur de cette thèse, pour leur disponibilité et leur précieux conseils.

Je remercie le fond CSP qui a financé mon doctorat et permis la réalisation de ces travaux durant les trois années.

Je souhaite remercier chaleureusement le Professeur Chantal Housset et le Docteur Axelle Cadoret pour m'avoir permis de réaliser cette thèse, la transmission de leurs connaissances, leur soutien, leur patience et leur confiance à mon égard.

Je remercie également Sara Lemoine pour ses conseils, son aide, son optimisme, sa disponibilité, et son expérience.

Je tiens à remercier des personnes particulières avec qui j'ai passé une grande partie de mon temps ces trois dernières années.

Haquima El Mourabit (avec un espace il faut rester cohérent), avec qui j'ai partagé énormément de moments durant ces trois années, notamment lors des coffee break du déjeuner. Elle m'a soutenue dans les moments de doutes et m'a beaucoup appris durant ces trois années. Merci pour ton soutien, pour la transmission de tes connaissances en expérimentation animale durement acquises, ton aide, les moments conviviaux et les rires partagés « j'y suis pas allée par 4 mots, ce soir c'est grâce mat ».

Sarah Mouri pour sa bonne humeur quotidienne, ses conseils, son soutien, et tous les bons moments partagés avec elle. Comme là si bien dit un jeune stagiaire « En fait, pour l'instant tu n'es rien du tout » mais je te souhaite une grande réussite en tant que médecin et dans la science.

Pauline Garnier qui m'a particulièrement aidé sur la RT-qPCR lorsque je ne maîtrisais pas encore si bien cet art mais surtout pour son dynamisme et sa sympathie.

Lauriane Petit, avec qui j'ai partagé, parfois sans filtre d'excellent moments, qui m'a écouté et soutenu dans des moments particuliers avec sa classe légendaire.

ChaBou pour son ironie déconcertante lui permettant, sous la tutelle d'Haquima, la réalisation d'un One Women Show mais également pour tous les bons moments au laboratoire et à l'extérieur.

Sans oublier Eva avec qui j'ai partagé de bons moments durant ces trois années malgré une disponibilité restreinte par l'excuse d'une culture cellulaire importante.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe, Alix, Astrid, Lin, Virginie, Lynda, Thomas, Tounsia, Jean-Louis, Véronique, Yves et Anne-Marie qui ont participé d'une manière ou d'une autre à ces trois années de travail au sein du laboratoire.

Je remercie Romain Morichon témoin de nos grandes discussions, pour tout ce qu'il m'a appris et pour son investissement sur les travaux d'imagerie. Je remercie aussi Annie Meunier qui m'a formé à la cytométrie en flux et qui m'a permis de découvrir l'incroyable potentiel de cette technique.

Je remercie particulièrement celle, qui malgré les aléas de la vie et la distance, m'a permis de me dépasser, de grandir et de réussir. Celle qui m'a poussé, soutenue, encouragé, qui a partagé mes doutes, mes réussites et mes peurs. Celle qui a toujours cru en moi et qui m'a conseillé et accompagné pendant cette thèse mais aussi durant tout mon parcours universitaire. Celle qui, réussi encore à me supporter, ce qui n'est pas toujours facile, et qui est à mes côtés maintenant depuis plusieurs années, Lucie Oumanetz.

Je remercie mes investisseurs privés, mes parents qui m'ont accompagné, soutenu, aidé et encouragé dans mes projets professionnels et privés. Eux qui m'ont inculqué cette attraction pour les sciences, et développé ma curiosité et mon envie d'apprendre. Je remercie mon petit frère, qui m'a encouragé, soutenu et auprès de qui j'aurais aimé être plus présent ces dernières années.

Je tenais à remercier également, ma grand-mère qui m'a toujours soutenu. Je dédie quelques lignes également à mon grand-père Roland, pour qui les études avaient une valeur importante, qui n'aura pas pu assister à la concrétisation de ces années de travail mais, j'en suis

persuadé, aurait été très fier de moi. Un grand merci à toute ma famille sur laquelle je peux compter et qui m'a soutenu durant ces années.

Je remercie également Victor un ami unique avec qui j'ai passé une partie de mes meilleurs moments et qui a toujours été présent et disponible pour moi, ainsi qu'à tous mes amis, et tous les autres qui m'ont permis de passer de très bons moments.

Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ces trois années de thèse qui m'ont permis de grandir, de découvrir la vie parisienne et la vie professionnelle, de rencontrer des gens extraordinaires qui m'ont permis d'évoluer.

## **Abréviations**

$\alpha$ SMA:  $\alpha$  Smooth Muscle Actin

ATF4: Activating Transcription Factor 4

ATF6: Activating Transcription Factor 6

ATF6f: Activating Transcription Factor 6 fragment

BCL-2: B-Cell Lymphoma 2

BDL: Bile Duct ligation

bFGF: basic Fibroblast Growth Factor

BSEP: Bile Salt Export Pump

CBP: Cholangite Biliaire Primitive

CCL4: tétrachlorure de carbone

CEFs: Cellules Etoilées du Foie

CHC: Carcinome Hépatocellulaire

CHOP: C/EBP Homologous Protein

COL15A1: Collagène XV alpha 1

CSP: Cholangite Sclérosante Primitive

DMSO: DiMéthylSulfOxyde

DR5: Death Receptor 5

EGF: Epithelial Growth Factor

eIF2 $\alpha$  :eukaryotic Initiation Factor 2  $\alpha$

ENTPD2: Ecto Nucleoside TriPhosphate Diphosphohydrolase 2

ERAD: Endoplasmic Reticulum Associated Degradation

ERK: Extracellular signal Regulated Kinase

ERO1: Endoplasmic Reticulum Oxydoreductase 1

FGF: Fibroblast Growth Factor

GADD34: Growth Arrest and DNA-Damage-inductible protein-34

GFAP: Glia Fibrillary Acidic Protein

GRP78: Glucose Regulated Protein 78

HFD: High Fat Diet

HIF-1 $\alpha$ : Hypoxic Inductible Factor 1 $\alpha$

IRE1: Inositol Required Enzyme 1

LPS: LipoPolySaccharide

MEC: Matrice Extra Cellulaire  
MFPs: MyoFibroblastes Portaux  
mTORC1: mammalian Target Of Rapamycin Complex 1  
NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases  
NASH: Non-Alcoholic SteatoHepatitis  
NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor kappa B  
NTCP: Na<sup>+</sup>-Taurocholate Cotransporting Polypeptide  
OATP: Organic Anion-Transporting Polypeptide  
PARP: Poly ADP-Ribose Polymérase  
PDI: Protein Disulfide Isomerase  
PERK: Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase  
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor  
PLC $\gamma$  : PhosphoLipase C  $\gamma$   
RE: Réticulum Endoplasmique  
RIDD: Regulated IRE1-Dependent Decay  
ROS: Reactive Oxygen Species  
S1P: Site-1 Protease  
S2P: Site-2 Protease  
Smad2: S mothers against decapentaplegic homolog 2  
TEM: Transition EpithélioMésenchymateuse  
TGF $\beta$ : Transforming Growth Factor  $\beta$   
TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
TUDCA: TauroUrsoDeoxyCholic Acid  
AUDC: UrsoDeoxyCholic Acid  
UPR: Unfolded Protein Reponse  
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
VHB: Virus de l'Hépatite B  
VHC: Virus de l'Hépatite C  
XBP1s: X-Box binding Protein 1 spliced  
XBP1u: X-Box binding Protein 1 unspliced

# Table des matières

PREAMBULE .....	1
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>3</b>
INTRODUCTION .....	4
I) LA FIBROSE HEPATIQUE .....	5
A) <i>La fibrogenèse</i> .....	5
B) <i>L'angiogenèse pathologique intra-hépatique</i> .....	7
1) Angiogenèse et régénération hépatique .....	7
2) Angiogenèse et fibrose .....	7
3) Thérapie anti-angiogénique et fibrose .....	8
II) LES MYOFIBROBLASTES HEPATIQUES .....	9
A) <i>Caractéristiques générales des myofibroblastes</i> .....	9
B) <i>Origines des myofibroblastes dans le foie</i> .....	10
C) <i>Les cellules étoilées du foie</i> .....	11
1) Rôle des CEFs quiescentes .....	11
2) Activation myofibroblastique des CEFs.....	12
D) <i>Les myofibroblastes portaux</i> .....	13
1) Caractéristiques des MFPs.....	14
2) Contribution des MFPs à la fibrose hépatique.....	15
III) LE STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE .....	18
A) <i>Le réticulum endoplasmique</i> .....	18
B) <i>L'UPR une réponse adaptative au stress du réticulum endoplasmique</i> .....	18
1) La voie IRE1 $\alpha$ .....	19
2) La voie ATF6.....	20
3) La voie PERK.....	21
4) Mécanismes d'activation de l'UPR.....	21
C) <i>Le devenir cellulaire</i> .....	23
1) Modulation de l'entrée en apoptose.....	23
2) Effet du stress du RE sur la prolifération et la migration .....	26
3) Le stress du RE et autophagie .....	27
D) <i>Le stress du RE dans les maladies du foie</i> .....	28
E) <i>Le stress du RE dans les myofibroblastes</i> .....	29
F) <i>Le stress du RE et l'angiogenèse</i> .....	30
IV) L'ACIDE URSODEOXYCHOLIQUE (UDCA).....	31
A) <i>Les indications cliniques de l'UDCA</i> .....	31
B) <i>Mécanismes d'action de l'UDCA</i> .....	32
C) <i>Effet de l'UDCA sur le stress du RE</i> .....	34
D) <i>Effet de l'UDCA sur les myofibroblastes</i> .....	35
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE .....	37
<b>RESULTATS .....</b>	<b>38</b>
I) CARACTERISATION DU MODELE CELLULAIRE DE MFPs DE RAT.....	39
A) <i>Introduction</i> .....	39
B) <i>Article « Culture Model of Rat Portal Myofibroblasts »</i> .....	40
C) <i>Discussion</i> .....	49

II)	ETUDE DU STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE DANS LES MFPs.....	50
A)	<i>Introduction</i> .....	50
B)	<i>Matériel et méthodes</i> .....	50
1)	Modèles cellulaires .....	50
2)	RT-qPCR .....	50
3)	Western-blot.....	51
4)	Ezyme Linked ImmunoSorbent Assay.....	51
5)	Prolifération cellulaire .....	52
6)	Migration cellulaire.....	52
7)	Matrigel-plug .....	53
8)	Analyse statistique.....	53
C)	<i>Résultats</i> .....	54
1)	Caractéristiques phénotypiques des MFPs activés in vivo.....	54
2)	Existence d'un stress du RE dans les MFPs activés in vivo.....	57
3)	Effet de l'induction du stress du RE sur les fonctions des MFPs.....	58
4)	Effet de l'inhibition du stress du RE dans les MFPs activés in vivo .....	61
D)	<i>Discussion</i> .....	63
III)	EFFET DE L'UDCA SUR LES MFPs ACTIVES <i>IN VIVO</i> .....	66
A)	<i>Introduction</i> .....	66
B)	<i>Matériel et méthodes</i> .....	67
C)	<i>Résultats</i> .....	67
1)	Inhibition du stress du RE par le TUDCA dans les MFPs activés in vivo .....	67
D)	<i>Discussion</i> .....	68
	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>70</b>
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	71
	TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	73
	BIBLIOGRAPHIE .....	74

## Préambule

La fibrose est une complication des maladies chroniques quelles qu'en soit leur étiologie et le tissu concerné. C'est un processus cicatriciel qui survient en réponse à une destruction tissulaire. Elle se caractérise par un dépôt de matrice extracellulaire principalement constitué de fibres de collagène. Lors de pathologies chroniques, on observe une modification quantitative mais également qualitative de la matrice extracellulaire qui s'accumule progressivement dans le tissu lésé provoquant une désorganisation cellulaire, et à terme, une défaillance de l'organe.

La matrice extracellulaire est synthétisée par les myofibroblastes qui jouent ainsi un rôle clé dans la fibrose. Ces cellules sont absentes des tissus en condition physiologique. Leurs précurseurs (e.g. les fibroblastes) sont activés par différents facteurs au cours des lésions chroniques et se différencient en myofibroblastes. Il existe plusieurs types de myofibroblastes dans le foie malade. Les myofibroblastes issus des cellules étoilées du foie sont les plus étudiés et jouent un rôle majeur dans la synthèse de la matrice extracellulaire. Une deuxième population de myofibroblastes hépatiques, généralement appelés myofibroblastes portaux, a récemment suscité beaucoup d'intérêt dans le domaine de la fibrose hépatique. Ces cellules sont encore peu étudiées et les outils pour les caractériser sont encore peu développés.

La lésion chronique à l'origine de la fibrose mais également la fibrose elle-même entraîne une modification globale du microenvironnement cellulaire. Ces différentes modifications comme la forte demande de synthèse de matrice extracellulaire par les myofibroblastes, le stress oxydant ou encore l'inflammation vont entraîner une perturbation de la synthèse protéique dans les cellules. Le réticulum endoplasmique est l'organite responsable de la maturation et du repliement des protéines. Seules les protéines matures et correctement repliées vont quitter le réticulum endoplasmique. Lors de la fibrogenèse, la demande en protéines augmente ainsi que le flux de protéines immatures vers le réticulum endoplasmique, pouvant ainsi entraîner une surcharge de l'organite et un stress du réticulum endoplasmique. En réponse à ce stress la cellule déclenche une réponse adaptative que l'on appelle Unfolded Protein Response (UPR). Cette réponse a pour objectif de restaurer l'homéostasie du réticulum endoplasmique et le cas échéant d'induire l'apoptose de la cellule afin d'éliminer de l'organisme des cellules aberrantes.

La fibrose hépatique affecte aussi bien les populations des pays occidentaux que les populations des pays en voie de développement. Sa prévalence est en augmentation dans le monde et en dehors de l'éviction de la cause, aucun traitement ne permet de bloquer sa progression. Seul l'acide ursodeoxycholique utilisé pour le traitement des maladies hépatiques d'origine biliaire semble en mesure dans le cas de ces maladies, de ralentir la progression de la fibrose sans pour autant la bloquer complètement.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'une part de caractériser le modèle de culture des myofibroblastes portaux et d'autre part d'étudier le rôle du stress du RE sur le phénotype et les fonctions des MFPs. Enfin nous avons analysé l'effet de l'acide ursodeoxycholique considéré comme une molécule chaperonne, sur le stress du RE sur les MFPs.

- Caractériser le modèle des myofibroblastes portaux isolés
- Déterminer si les myofibroblastes portaux sont soumis à un stress du réticulum endoplasmique lors de fibrogenèse d'origine biliaire.
- Déterminer l'effet du stress du réticulum endoplasmique sur les caractéristiques et les fonctions de myofibroblastes portaux.
- Déterminer l'effet de l'acide ursodeoxycholique considéré comme une molécule chaperonne, sur le stress du réticulum endoplasmique dans ces cellules.

Dans une première partie introductive nous rapporterons l'état des connaissances scientifiques sur la fibrose hépatique, les myofibroblastes portaux, le stress du réticulum endoplasmique et l'acide ursodeoxycholique. Puis dans une seconde partie nous exposerons les résultats des travaux. Pour terminer, dans une troisième partie nous conclurons et discuterons des résultats et des perspectives apportées par ces travaux.

Première Partie :

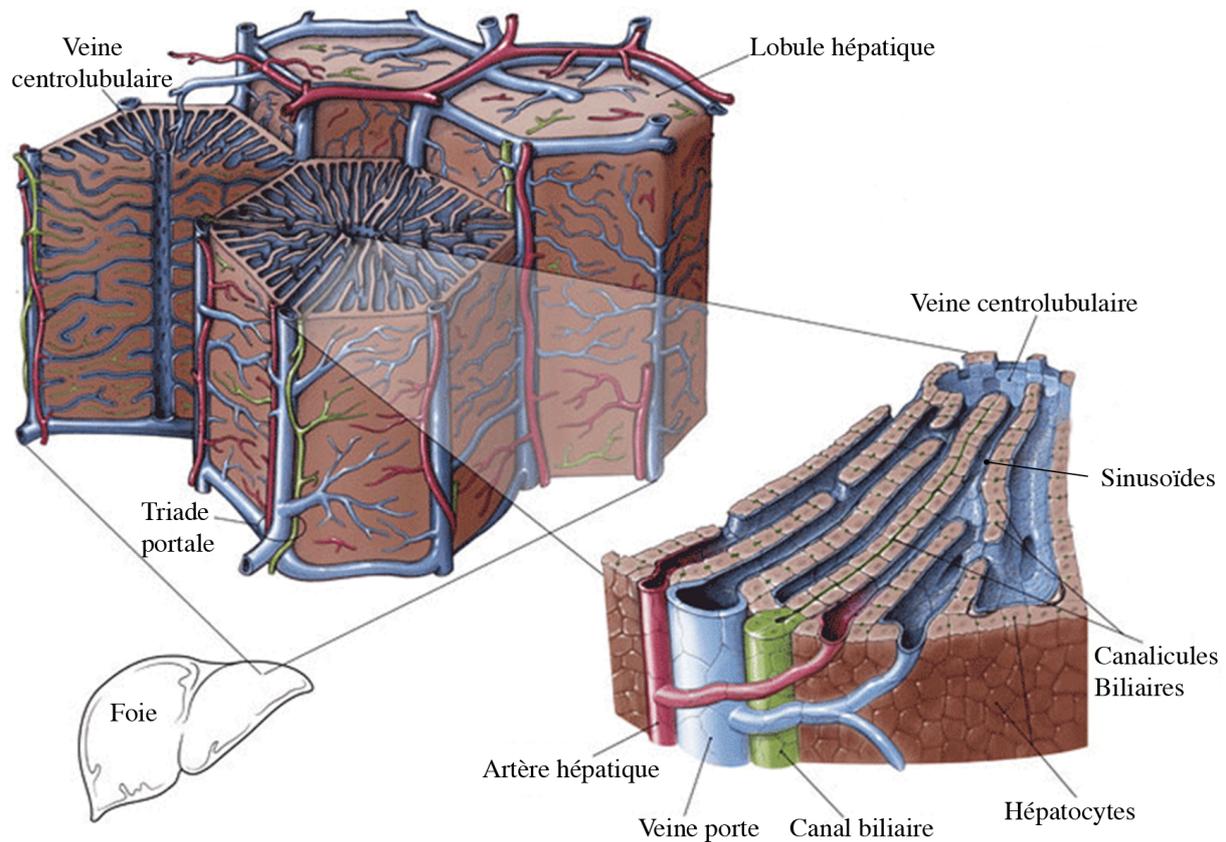
**Introduction**  
**Bibliographique**

## Introduction

Le foie est composé de plusieurs types cellulaires, parmi lesquels les hépatocytes sont les cellules majoritaires (70% des cellules du foie). Ils forment le tissu parenchymateux et assurent les principales fonctions hépatiques. Les autres types cellulaires, comportent : les cholangiocytes, (cellules épithéliales qui bordent les canaux biliaires) ; les cellules étoilées du foie et d'autres cellules mésenchymateuses telles que les cellules musculaires lisses et les fibroblastes des espaces porte ; les cellules de Kupffer, qui sont les macrophages du foie ; les cellules endothéliales des sinusoides, des veines portes et des branches de l'artère hépatique.

Le lobule hépatique est l'unité fonctionnelle du foie. Il se compose de travées hépatocytaires formant des feuillettes d'une à deux couches de cellules. Ces feuillettes sont séparés les uns des autres par les sinusoides (**figure 1**). La triade portale se compose d'une branche de l'artère hépatique, d'une branche de la veine porte et d'un canal biliaire. Elle alimente trois lobules hépatiques en sang veineux et artériel et permet l'écoulement de la bile en provenance des lobules hépatiques. Le sang veineux se mélange au sang artériel dans les sinusoides qui se drainent dans la veine centrolobulaire. Les hépatocytes sont séparés des capillaires sinusoides par l'espace de Disse où ils émettent des villosités par lesquelles s'effectuent les échanges avec le sang des sinusoides. En parallèle des sinusoides, les canalicules biliaires forment un second réseau localisé entre deux travées hépatocytaires. Le flux de la bile, contrairement à celui des sinusoides, s'écoule de la zone périvasculaire vers le canal biliaire de l'espace porte formé par les cholangiocytes puis vers la vésicule biliaire.

Le foie intervient dans le stockage des vitamines, la détoxification et dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides. Il assure ainsi l'homéostasie de ces différents constituants de l'organisme.



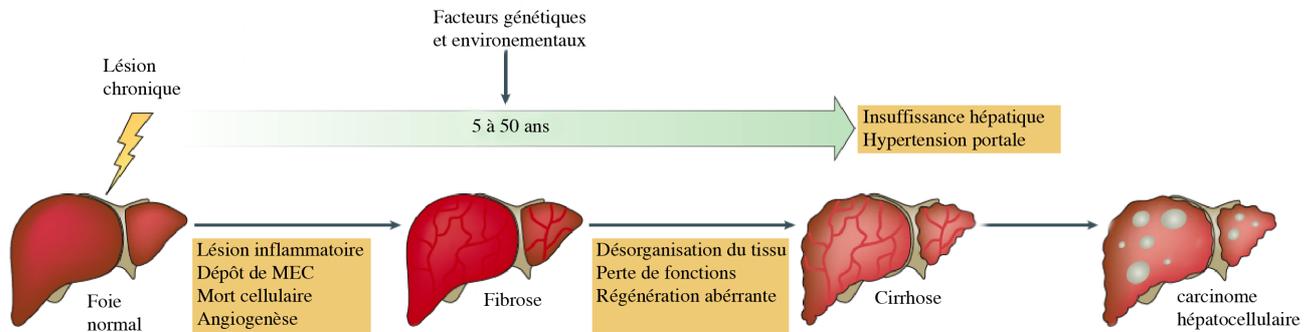
**Figure 1 : Le lobule hépatique, unité fonctionnelle du foie**

## I) La Fibrose hépatique

### A) La fibrogenèse

La fibrose est un processus cicatriciel qui survient en réponse à une lésion chronique. La sécrétion de matrice extracellulaire (MEC), principalement composée de fibres de collagènes, permet de combler le vide laissé par la destruction cellulaire causée par une lésion. La fibrose est un tissu inerte synthétisé par les myofibroblastes. Les maladies chroniques du foie sont de plus en plus fréquentes à travers le monde, aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays occidentaux. La fibrose hépatique est un processus cellulaire dynamique, complexe et réversible. Le plus souvent asymptomatique elle conduit à une accumulation excessive de MEC dont la cirrhose est le dernier stade d'évolution (**figure 2**). La cirrhose s'accompagne de multiples complications comme l'hypertension portale, l'insuffisance hépatique voire l'apparition de carcinome hépatocellulaire (CHC). La

progression de la fibrose remplace petit à petit les hépatocytes détruits (1). Cette progression de la fibrose se caractérise par l'apparition de septa fibreux, dont le stade d'avancement est défini par le score METAVIR (**tableau 1**) (2).



**Figure 2 : Evolution naturelle de la fibrose hépatique (3)**

En condition pathologique, la MEC se compose de collagène I et III alors qu'elle est principalement constituée de collagène IV et VI en condition physiologique. Cette différence qualitative modifie les propriétés mécaniques, physiques mais aussi biochimiques de la MEC et contribue à la modulation de plusieurs fonctions cellulaires. La régulation de la MEC est assurée par les myofibroblastes. Ils sont impliqués dans la synthèse mais aussi dans la dégradation de la MEC lors de la phase de résolution (4).

Score METAVIR	Caractéristiques
F0	Absence de fibrose
F1	Fibrose portale et périportale, pas de septa fibreux
F2	Fibrose portale et périportale, rares septa fibreux
F3	Fibrose portale et périportale, nombreux septa fibreux
F4	Cirrhose, fibrose annulaire délimitant les nodules de régénération

**Tableau 1 : Classification et description du score de fibrose METAVIR (2)**

## B) L'angiogenèse pathologique intra-hépatique

L'angiogenèse est un processus physiologique permettant la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants sous l'impulsion de facteurs pro-angiogéniques tels que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

### 1) *Angiogenèse et régénération hépatique*

L'angiogenèse est un processus important lors de la régénération hépatique. En effet, une augmentation de la densité des microvaisseaux a été clairement montrée associée à la régénération hépatique après hépatectomie partielle. Au contraire lorsqu'on inhibe l'angiogenèse, la régénération hépatique diminue de moitié (5). L'hépatectomie partielle entraîne une intense prolifération des cellules hépatiques, à l'origine de la régénération du foie, ce qui nécessite un apport important en oxygène et en nutriments. La vascularisation étant déficiente au début de la régénération, les cellules hépatiques se retrouvent en hypoxie et vont alors synthétiser des facteurs de la famille Hypoxia Inductible Factor (HIF) impliqués dans la sécrétion du facteur angiogénique VEGF. Cependant ce modèle de régénération hépatique ne reflète pas le processus de régénération observé dans les maladies hépatiques chroniques. En effet, lors d'une maladie chronique du foie la régénération hépatique est influencée par différents facteurs comme la nécrose cellulaire, les cellules immunitaires ou encore l'inflammation (3).

### 2) *Angiogenèse et fibrose*

Il existe un processus angiogénique dit pathologique car persistant et aboutissant à la formation de vaisseaux ayant un phénotype différent des vaisseaux sains. Dans les maladies hépatiques, la régénération et la fibrose sont concomitantes. En même temps que la régénération, la cicatrisation et l'inflammation sont rapidement activées afin de maintenir la fonction et la structure hépatique incluant le système sanguin et biliaire. En réponse à une lésion hépatique une activation de l'angiogenèse avec la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, de nouveaux sinusoides et un remodelage vasculaire a été montré (6). De plus la fibrose entraîne une hypoxie du tissu hépatique qui augmente parallèlement à la progression de la fibrose (7, 8). Le dépôt excessif de MEC au cours de la fibrose crée une compression des vaisseaux sanguins

hépatiques entraînant une résistance au flux sanguin et donc une réduction du débit aboutissant à une hypoxie du tissu. Cette hypoxie va stimuler l'angiogenèse par différents mécanismes. Premièrement, par une augmentation de la transcription et de la traduction du facteur pro-angiogénique VEGF synthétisé par les hépatocytes et les myofibroblastes en hypoxie (7, 8). La liaison du VEGF à son récepteur sur les cellules endothéliales va ainsi induire la formation de nouveaux vaisseaux. Deuxièmement, par la synthèse du Platelet Derived Growth factor (PDGF) impliqué dans la stabilisation des néo-vaisseaux par les péricytes. Cependant ces néo-vaisseaux sont immatures et donc inefficaces dans la résolution de l'hypoxie, ils sont à l'origine de shunts vasculaires au niveau des zones de régénération perturbant entre autres la communication cellulaire. Enfin, la formation des nouveaux vaisseaux induit par l'hypoxie entraîne une désorganisation de l'architecture tissulaire aggravant le phénomène d'hypoxie déjà présent. Ce cercle vicieux est responsable d'une hypoxie persistante et d'une stimulation de la fibrose (9).

En effet, des études menées sur des modèles animaux de ligature de la voie biliaire principale (BDL) ou d'intoxication au tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) ont permis de corréler l'augmentation de l'angiogenèse avec la progression de la fibrose (10-13). Cette corrélation a également été démontrée chez les patients atteints par des maladies hépatiques comme l'hépatite virale C, la cholangite biliaire primitive (CBP) ou la cholangite sclérosante primitive (CSP). En outre, en fonction des différents modèles d'évolution de la fibrose (biliaire ou post nécrotique), l'angiogenèse peut influencer la progression de la maladie et affecter la réversibilité de la fibrose (6). L'environnement hypoxique va conduire notamment à la surexpression du facteur angiogénique HIF. De plus, il a été montré que l'expression de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est augmentée dans les hépatocytes issus d'un modèle de souris BDL. Ce facteur régule la synthèse des facteurs profibrosants comme le PDGF et le FGF-2 (14) ainsi que d'autres gènes impliqués dans l'activation des CEFs, la production de collagène et l'angiogenèse (11, 15, 16).

### *3) Thérapie anti-angiogénique et fibrose*

Des stratégies visant à inhiber les récepteurs du VEGF et du PDGF ainsi que leurs voies de transduction ont été mises en œuvre dans les maladies hépatiques chroniques et ont montré, dans différents modèles, une diminution significative de la vascularisation hépatique, de l'infiltration inflammatoire et du dépôt de MEC. Ces effets ont été associés à une inhibition de

l'activation des CEFs et de la progression de la fibrose intra-hépatique (10, 17). Cependant il a été montré que l'inhibition *in vivo* de l'intégrine alpha v beta 3 induisait une diminution de l'angiogénèse mais favorisait la progression de la fibrose dans deux modèles de fibrose hépatique suggérant aussi un possible rôle protecteur de l'angiogénèse vis à vis de la fibrose hépatique (18). Une autre étude a montré que, dans un modèle BDL, la résolution de la fibrose normalement observée après dérivation de la bile dans les voies digestives était inhibée par un traitement avec un anticorps neutralisant anti-VEGF (19). Bien que l'inhibition de l'angiogénèse semble être prometteur dans le traitement de la fibrose, ces résultats mettent en lumière un mécanisme beaucoup plus complexe et l'effet de cette inhibition sur la régénération hépatique à long terme est incertain. En effet, l'inhibition soutenue et complète de l'angiogénèse pourrait perturber le flux sanguin et l'apport d'oxygène et donc compromettre la régénération hépatique. Il existe un fragile équilibre entre l'angiogénèse nécessaire à la régénération hépatique et l'angiogénèse délétère favorisant la fibrose.

## **II) Les myofibroblastes hépatiques**

### A) Caractéristiques générales des myofibroblastes

Les myofibroblastes sont présents dans tous les tissus pathologiques. Ils se caractérisent d'un point de vue morphologique par la présence en abondance de microfilaments du cytosquelette et par les jonctions fibronexus qu'ils forment avec la MEC leur permettant de se contracter et de remodeler la MEC. Les myofibroblastes expriment également des protéines spécifiques pouvant être utilisées comme marqueurs phénotypiques de ces cellules. La plus utilisée est l'actine musculaire lisse  $\alpha$  ( $\alpha$ SMA). Cette protéine est absente des précurseurs des myofibroblastes et uniquement exprimée après leur différenciation myofibroblastique (20). Les myofibroblastes combinent donc les propriétés des cellules fibroblastiques, c'est à dire la capacité de synthétiser la MEC et les propriétés contractiles de cellules musculaires lisses. Cependant les myofibroblastes n'expriment pas les marqueurs de cellules musculaires lisses comme la chaîne légère de la myosine ou la smoothelin et se distinguent donc des cellules musculaires lisses (21). Lors de la différenciation myofibroblastique ces cellules acquièrent la capacité de synthétiser la MEC, de migrer, de se contracter et de proliférer.

De manière générale, la cicatrisation se compose de trois phases : la phase inflammatoire, la phase proliférative et la phase de régénération. Durant la phase inflammatoire différentes cytokines et chimiokines sont sécrétées permettant ainsi le recrutement des fibroblastes qui vont, par chimiotactisme migrer vers la lésion. La seconde phase se caractérise par l'activation des fibroblastes avec l'acquisition de l'expression de l' $\alpha$ SMA puis ces cellules vont proliférer et synthétiser la MEC. Enfin durant la phase de régénération la MEC va être totalement remodelée par des enzymes protéolytiques, principalement des métallo-protéinases matricielles synthétisées par les myofibroblastes. Le collagène III est progressivement remplacé par le collagène I (22). Dans un contexte de pathologie aigüe, lorsque le tissu est suffisamment restauré les myofibroblastes entrent en apoptose. En condition chronique cette phase de résolution n'a pas lieu et entraîne un dépôt de MEC anormal. La fibrose est donc un déséquilibre entre fibrogenèse et fibrolyse (23). L'activation myofibroblastique est régulée par une cytokine clé, le TGF- $\beta$ . L'entrée en apoptose des myofibroblastes durant la phase de résolution est corrélée à une diminution locale de la concentration en TGF- $\beta$ . Cependant en condition pathologique la sécrétion de cette cytokine persiste induisant une activation continue des myofibroblastes (24).

Les signaux mécaniques, comme la rigidité de la MEC et sa composition, jouent également un rôle dans l'activation des myofibroblastes. La MEC est, en condition physiologique, un tissu souple et riche en fibrine. La culture de fibroblastes sur un support reproduisant ces caractéristiques montre une faible activation myofibroblastique (25). Au contraire, la rigidité tissulaire ou celle du support de culture est capable d'induire une activation myofibroblastique. De plus, la nature contractile des myofibroblastes induit une tension mécanique au niveau de la MEC conduisant à une diminution de son élasticité et donc à une augmentation de la rigidité de la MEC lors du processus de cicatrisation qui permet une stimulation de la différenciation myofibroblastique (26). A l'inverse, la diminution du stress mécanique entraîne une augmentation de l'apoptose et une diminution de l'expression de l' $\alpha$ SMA et de la contractilité des myofibroblastes (27, 28).

## B) Origines des myofibroblastes dans le foie

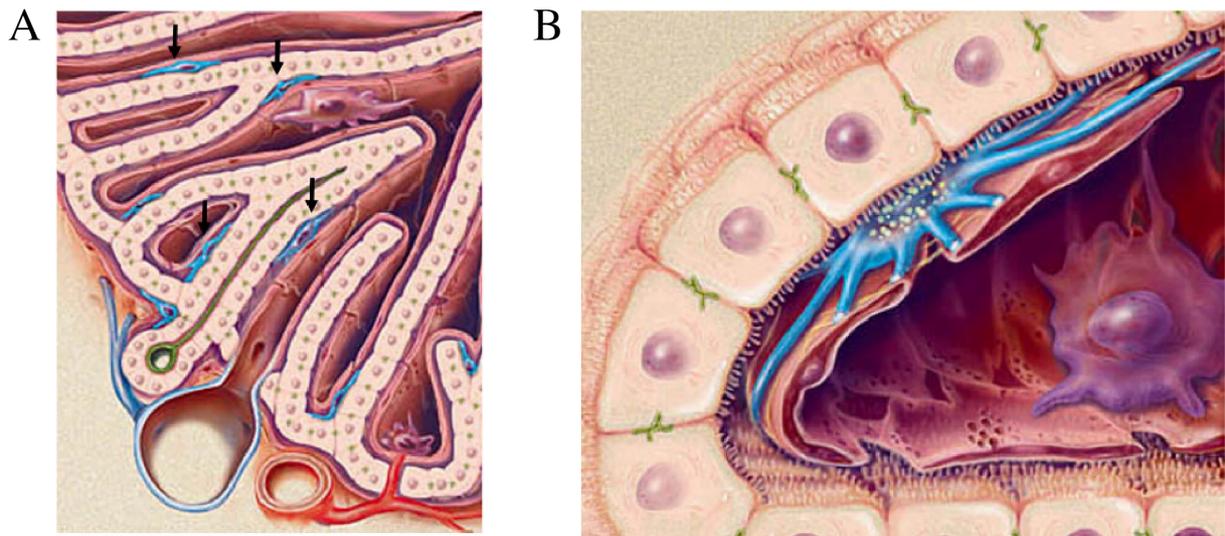
Comme ils sont absents de tout tissu sain, les myofibroblastes sont absents du foie sain. Ils apparaissent et s'accumulent en cas de pathologie du foie, de façon proportionnelle à la

fibrose. Les myofibroblastes du foie comme ceux des autres tissus, forment une population cellulaire hétérogène. Ils proviennent principalement de la transdifférenciation des cellules étoilées du foie et de cellules mésenchymateuses de l'espace porte, aboutissant respectivement à la formation des CEFs myofibroblastiques et des myofibroblastes portaux. Cependant, d'autres origines ont été proposées pour les myofibroblastes hépatiques comme les fibrocytes d'origine extrahépatique dérivant de la moelle osseuse. Ces cellules combinent les caractéristiques des cellules fibroblastiques et hématopoïétiques. Cependant elles ne représenteraient qu'un faible pourcentage des cellules hépatiques pour le collagène I (29) et leur rôle réel dans la fibrose hépatique n'est pas confirmé (30). Un processus de transdifférenciation de cellules épithéliales appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) a également été évoqué dans la genèse des myofibroblastes hépatiques. En effet, des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence une diminution d'expression des marqueurs épithéliaux dans les hépatocytes et les cholangiocytes au profit de l'expression de marqueurs myofibroblastiques au cours de la fibrose (31). Néanmoins, des expériences de lignage cellulaire ont démontré que durant la fibrose hépatique, les myofibroblastes n'étaient pas issus d'une TEM (32, 33). Ces études n'excluent pas l'existence d'une TEM des cellules cancéreuses intervenant dans la progression tumorale (34). Les myofibroblastes hépatiques sont donc principalement issus des CEFs et des cellules mésenchymateuses de l'espace porte.

### C) Les cellules étoilées du foie

#### 1) *Rôle des CEFs quiescentes*

Les CEFs ont été appelées de différentes façons (cellules de Ito ou encore lipocytes) par le passé. Dans un foie sain, les CEFs représentent 3 à 5% des cellules hépatiques (23). Ces cellules sont localisées dans l'espace de Disse, c'est à dire entre les sinusoides et les travées hépatocytaires, (**figure 3**) autour des cellules endothéliales sinusoidales. A l'état normal, les CEFs sont quiescentes par opposition à un phénotype myofibroblastique dit « activé ».



**Figure 3 : Localisation des cellules étoilées du foie (23)**

*Les cellules étoilées du foie (en bleu) sont localisées dans l'espace de Disse entre les cellules endothéliales des sinusoides (en rouge) et les hépatocytes (en beige).*

A l'état quiescent, les CEFs jouent principalement un rôle dans le stockage de l'acide rétinoïque ou vitamine A. Elles assurent 80% des réserves en vitamine A de l'organisme (35). Cependant, de plus en plus d'études suggèrent un rôle des CEFs dans la physiologie hépatique. Les CEFs auraient des propriétés de cellules souches lors de la régénération hépatique (36). Par ailleurs, les CEFs participent à l'homéostasie de la MEC en assurant son renouvellement et interviennent dans la vasorégulation en tant que péricytes. En effet, leur localisation particulière autour des cellules endothéliales sinusoidales leur permet de réguler les échanges intrahépatiques entre le sang des sinusoides et les hépatocytes en modulant le tonus vasculaire (23, 37, 38). Les CEFs agissent également sur les cellules endothéliales en les maintenant dans un état de différenciation sinusoidale (39, 40).

## 2) Activation myofibroblastique des CEFs

L'implication des CEFs dans la fibrose hépatique a été décrite pour la première fois dans les années 70. Ces cellules ont été les premières identifiées comme étant une source de collagène dans le foie pathologique (41) et ont longtemps été considérées comme unique précurseur des myofibroblastes hépatiques (23).

La vitamine A contenue dans le cytoplasme des CEFs leur confère une faible densité, permettant la mise au point d'une méthode d'isolement standardisée. Les CEFs isolées vont se différencier spontanément en myofibroblastes sur des supports plastiques de culture cellulaire (42-44). L'utilisation de ce modèle de culture, dont on considère qu'il mime l'activation des CEFs *in vivo*, a permis de bien caractériser les mécanismes de différenciation myofibroblastique de ces cellules. Les facteurs déclenchant cette activation sont multiples. Ces sont des facteurs biologiques comme le LPS ou certaines cytokines, des facteurs physico-chimiques comme le stress oxydant, l'hypoxie ou encore mécaniques comme la rigidité tissulaire (23, 45). La différenciation myofibroblastique des CEFs se décompose en deux phases, la phase d'initiation ou pré-inflammatoire et la phase de perpétuation. La phase d'initiation induite par stimulation paracrine des CEFs par les cellules voisines, conduit à l'activation des CEFs, c'est à dire à l'acquisition d'un phénotype myofibroblastique. Durant la phase de perpétuation, les CEFs synthétisent la MEC, forment le tissu cicatriciel, et développent leur capacité de se contracter et de migrer sous l'effet de chemoattractants (23).

Les études *in vitro* ont permis de proposer différents marqueurs des CEFs comme la desmine ou la Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) qui ont été utilisés pour étudier *in vivo* l'implication des CEFs dans la fibrose (46). Récemment, une étude de lignage cellulaire, reposant sur l'utilisation du promoteur de la protéine lécithine rétinol acétyltransférase couplé à la GFP comme traceur des CEFs, a montré que la majorité des cellules  $\alpha$ SMA positives dérivait des CEFs dans plusieurs modèles de fibrose (47).

#### D) Les myofibroblastes portaux

Une autre population de myofibroblastes hépatiques semble avoir un rôle déterminant dans la fibrose hépatique mais l'intérêt pour ces cellules appelées myofibroblastes portaux (MFPs) n'est que récent. Différents arguments plaident en faveur d'un rôle des myofibroblastes localisés dans l'espace porte. Ainsi, il a été mis en évidence des myofibroblastes hépatiques non issus des CEFs, résidant dans l'espace porte (48, 49). De plus, l'étude par immunohistochimie de foies fibreux de rat ou de patients, a montré que les myofibroblastes localisés dans les espaces portes avaient un profil d'expression différent de celui des myofibroblastes localisés dans les sinusoides, suggérant qu'il existe bien deux populations distinctes de myofibroblastes hépatiques dans le foie pathologique (46). Enfin, dans toutes les

maladies chroniques du foie, quelle que soit l'étiologie, la fibrose débute dans les espaces porte avant de s'étendre au lobule créant ainsi des travées de fibrose que l'on appelle septa fibreux (50, 51), évoquant un rôle possible des MFPs dans la progression de la fibrose hépatique.

### 1) *Caractéristiques des MFPs*

La majorité de nos connaissances sur ces cellules reposent sur un modèle de MFPs de rat en culture. Ce modèle basé sur des travaux de notre équipe (49, 52), a fait l'objet d'un travail de caractérisation durant cette thèse (53). Les myofibroblastes obtenus par cette méthode se distinguent des CEF myofibroblastiques par leurs caractères morphologiques et fonctionnels en culture. En effet, en culture les CEF myofibroblastiques ont une forme arrondie, un cytoplasme volumineux et entrent rapidement en senescence après 1 passage en culture, alors que les MFPs présentent une forme allongée et de nombreuses fibres de stress et prolifèrent intensément même après plusieurs passages (Bosselut, et *al.* 2010 ; données personnelles non publiées). Par ailleurs, une analyse protéomique menée dans notre laboratoire a montré que les protéines surexprimées dans les MFPs par rapport aux CEFs myofibroblastiques étaient principalement liées aux fonctions spécifiques des cellules myofibroblastiques (52).

D'autres modèles cellulaires ont été utilisés pour étudier les MFPs *in vitro*. Des auteurs ont obtenu des myofibroblastes appelés « rat liver myofibroblasts » issus de l'activation d'une fraction de cellules non parenchymateuses distinctes des CEFs d'un foie de rat sain (54). Un second modèle, nommé « fibroblastes portaux », regroupe les cellules mésenchymateuses individuelles obtenues après digestion enzymatique de l'arbre biliaire d'un foie de rat sain (55). Ces fibroblastes portaux se caractérisent par l'expression de la protéine Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 2 (ENTPD2) et peuvent se différencier en myofibroblastes (56, 57). Cette différenciation entraîne néanmoins la perte progressive de l'expression de l'ENTPD2. Les MFPs regroupent probablement les myofibroblastes obtenues dans ces différents modèles.

Quelques marqueurs des MFPs plus ou moins discriminants vis à vis des CEFs myofibroblastiques ont été identifiés comme la Fibulin-2, Thymocyte différenciation antigen-1 (Thy-1), gremlin-1, fibronectin-1 et l'élastine (54, 58-60) Thy-1 et gremlin-1 sont également exprimés dans les cellules souches mésenchymateuses tandis que l'élastine et la Fibulin-2,

principaux composants des fibres élastiques de la MEC, sont notamment exprimées par les fibroblastes interstitiels et les cellules musculaires lisses (61-64). De plus nos travaux récents ont montré que la fibuline-2 est également exprimée dans les CEFs myofibroblastiques en culture (65). Une analyse comparative du transcriptome des MFPs et des CEFs myofibroblastiques menée dans notre laboratoire a permis d'identifier un marqueur permettant de discriminer les MFPs de toutes les autres cellules du foie : le collagène XV alpha 1 (COL15A1) (65).

## 2) Contribution des MFPs à la fibrose hépatique

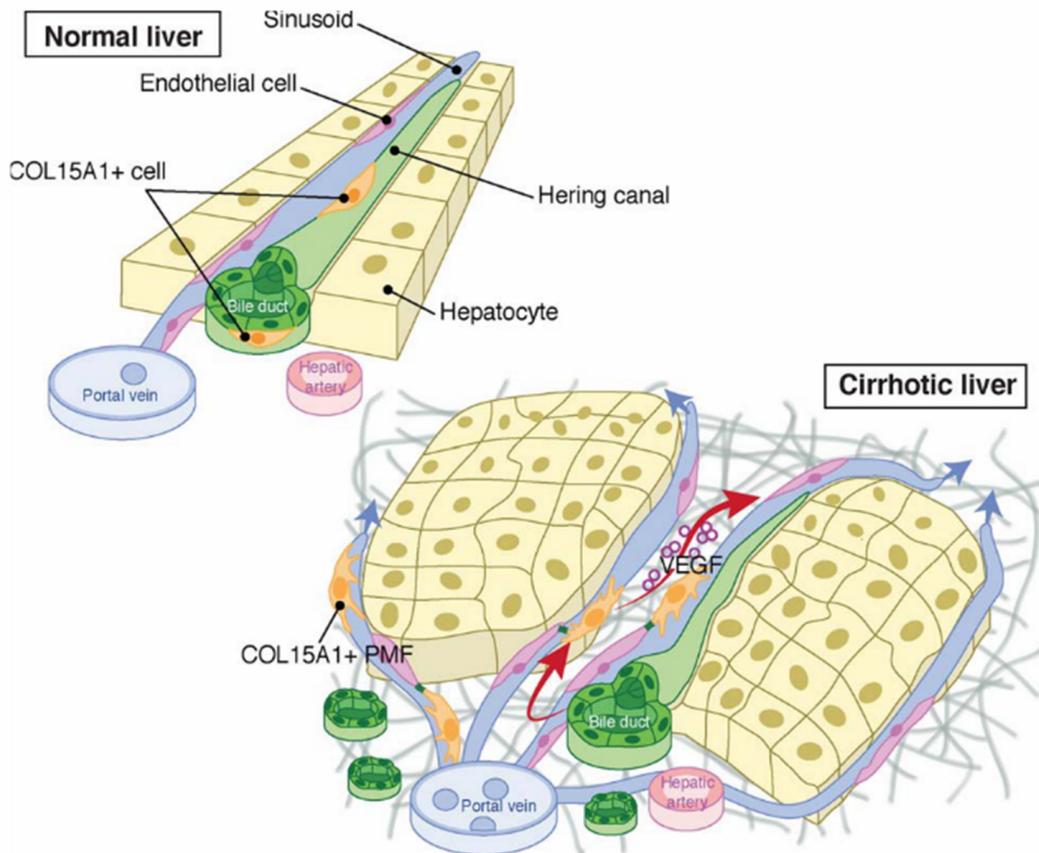
Bien que largement moins étudiés que les CEFs, les MFPs et leur rôle dans la fibrose hépatique commencent à être mieux connus. L'implication des MFPs a été particulièrement démontrée dans la fibrose de type biliaire. Tuchweber et *al.* ont mis en évidence la prolifération de cellules  $\alpha$ SMA-positives/desmagine-négatives, donc non issues des CEFs, à proximité des canaux biliaires immédiatement après BDL chez le rat (56). De la même façon, nous avons montré, dans deux modèles de fibrose biliaire, que la majorité des myofibroblastes qui s'accumulent sont desmagine négatifs (48, 66). Ces résultats suggèrent un rôle prédominant des MFPs dans la fibrose biliaire, plus particulièrement au stade précoce, alors que les CEFs interviendraient au cours de la progression de la fibrose. En accord avec cette hypothèse, une étude plus récente a montré que les MFPs représentaient 70% du pool des myofibroblastes dans des souris BDL, alors qu'ils ne représentaient que 13% dans le modèle CCl<sub>4</sub>, mais que cette proportion diminuait au profit des CEFs myofibroblastiques au cours de la progression de la fibrose biliaire (60).

La première réaction des cholangiocytes lors d'une lésion cholestatique est appelée « réaction ductulaire » et se caractérise par une intense prolifération des cholangiocytes et une expansion des cellules progénitrices hépatiques (67). Les MFPs pourraient réguler la prolifération des cholangiocytes par l'intermédiaire de l'acide hyaluronique et de sa liaison au récepteur CD44 exprimé par les cholangiocytes. En effet, il a été montré que l'acide hyaluronique, sécrété en grande quantité dans l'espace porte pendant la fibrose biliaire était capable de stimuler la prolifération des cholangiocytes en culture (68). Durant cette réaction ductulaire les cholangiocytes vont sécréter des facteurs de croissance comme le PDGF ou le TGF- $\beta$  capables d'activer les MFPs et d'augmenter la sécrétion de MEC (69, 70). La cinétique

différente d'activation des MFPs et des CEFs dans le modèle de cholestase s'expliquerait par une atteinte précoce des cholangiocytes entraînant une activation des MFPs et une atteinte plus tardive des hépatocytes entraînant l'activation des CEFs. Cette différence s'expliquerait également par l'expression du récepteur de l'interleukine 25 (ILR25) par les MFPs et leur capacité à sécréter l'interleukine 13 (IL13). En effet lors d'une cholestase le taux d'interleukine 25 (IL25) augmente induisant l'activation des MFPs via leur récepteur IL-25, ce qui entraîne la sécrétion d'IL13 facilitant l'activation des CEFs (60, 64). Ces résultats appuient l'hypothèse proposée par notre équipe selon laquelle les MFPs seraient les premiers répondeurs et permettraient l'activation et la migration des CEFs (65).

Néanmoins, le rôle des MFPs dans la fibrose hépatique reste controversé. Une étude de lignage cellulaire suggère que les CEFs sont la principale source de myofibroblastes quelle que soit l'étiologie de la fibrose, puisqu'ils seraient à l'origine de 82 à 96 % des myofibroblastes dans différents modèles (toxique, cholestatique et métabolique) (47). Ces résultats ont été confirmés par une étude plus récente (71).

Les études comparatives *in vitro* des MFPs et des CEFs myofibroblastiques que nous avons menées au laboratoire nous ont permis d'identifier des gènes/protéines spécifiques et de proposer des fonctions différentes pour chacun des 2 types cellulaires (52, 65). Ainsi, ces études à partir des modèles cellulaires suggèrent que les CEFs seraient impliquées dans la réparation/régénération alors que les MFPs interviendraient dans la formation de la fibrose (52). Nous avons récemment identifié le Col15a1, comme marqueur discriminant des MFPs. Nos travaux montrent que, chez les patients comme dans les modèles animaux, l'expression de Col15a1 augmente dans les stades avancés de fibrose, qu'elle soit d'origine biliaire ou non, traduisant une prolifération de ces cellules (65). Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence un rôle angiogénique des MFPs *via* la sécrétion de VEGF-A en réponse à différents stimuli (hypoxie, milieu sécrété de cholangiocytes) qui nous a conduit à proposer un rôle clé de ces cellules dans le remodelage vasculaire associé à la cirrhose (**figure 4**).



**Figure 4 : Contribution des MFP au remodelage vasculaire au cours de la progression de la fibrose hépatique**

*Le foie normal contient un petit nombre de cellules COL15A1 positives adjacentes aux canaux biliaires et aux canaux de Hering. Lors de la fibrose du foie, ces cellules COL15A1 positives donnent naissance aux MFPs qui favorisent le remodelage vasculaire et font progresser la fibrose des espaces portes vers l'intérieur du lobule.*

D'autres arguments plaident en faveur d'une participation des MFPs à la fibrose et à l'angiogenèse. En effet, les MFPs sont impliqués dans la production des fibres élastiques dans le foie permettant aux vaisseaux de supporter les cycles de dilatation et de contraction, et sembleraient être impliqués dans la stabilisation des canaux biliaires. De plus, le Col15A1 sécrété par les MFPs stabilise et fournit aux microvaisseaux leur résistance aux contraintes mécaniques. Le Col15A1 forme une matrice pro-angiogénique pour les cellules endothéliales et contribuerait ainsi aux propriétés angiogéniques des MFPs (72).

### **III) Le stress du réticulum endoplasmique**

#### **A) Le réticulum endoplasmique**

Le réticulum endoplasmique (RE) est développé dans les cellules sécrétrices dans lesquelles il assure la maturation et le repliement des protéines (73). C'est l'un des plus gros organites des cellules eucaryotes. Il est formé d'un réseau de membranes internes interconnectées en continuité avec la membrane nucléaire. Il existe deux types de RE : le RE lisse qui est impliqué spécifiquement dans la synthèse lipidique et le RE rugueux impliqué dans la synthèse protéique. Le RE lisse possède une structure tubulaire interconnectée alors que le RE rugueux est constitué d'un empilement de sacs aplatis en continuité avec le RE lisse formant ainsi un seul et unique organite. Le RE intervient également dans le stockage du calcium intracellulaire. Le repliement est une étape cruciale pour la maturation des protéines sécrétées qui représentent environ 30% du protéome. Ce processus est particulièrement mis à l'épreuve dans les cellules sécrétrices où la forte demande de synthèse protéique constitue une source de stress constante. Aucune protéine mal repliée ne sort du réticulum endoplasmique. L'efficacité et la fidélité du repliement protéique est constamment contrôlée et ajustée par les signaux environnementaux et cellulaires qui assurent un rétrocontrôle dynamique, afin de maintenir l'homéostasie du réticulum endoplasmique (74). Il arrive que l'homéostasie du réticulum endoplasmique soit perturbée, créant un déséquilibre entre la quantité de protéines immatures entrant dans le RE et la capacité de celui-ci à gérer ce flux. C'est ce qu'on appelle le stress du réticulum endoplasmique.

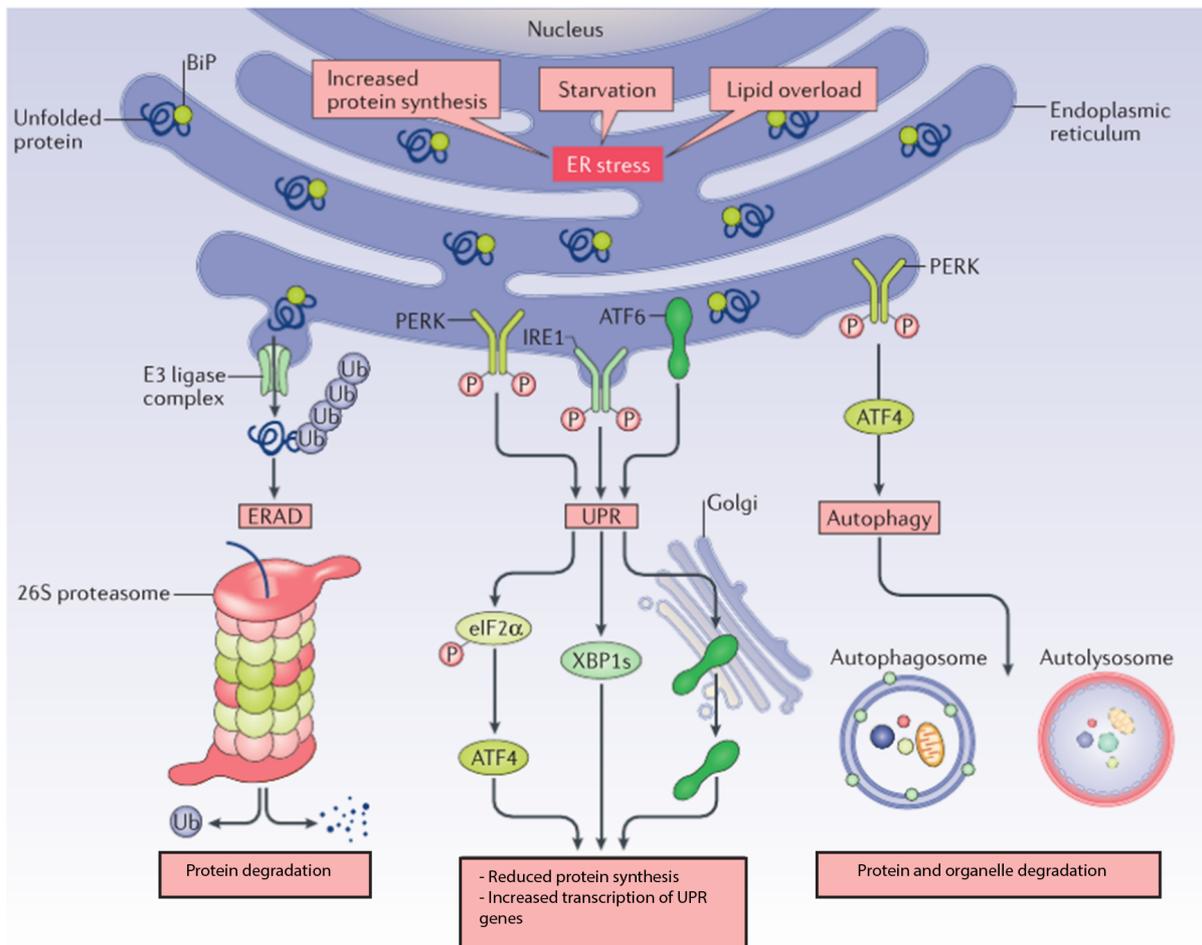
#### **B) L'UPR une réponse adaptative au stress du réticulum endoplasmique**

Afin de retourner à un état homéostatique, la cellule induit une réponse adaptative que l'on nomme Unfolded Protein Response (UPR) (75). L'UPR est composée de trois mécanismes, dont les deux premiers correspondent à une réponse adaptative visant à restaurer l'homéostasie. La première, est une réponse adaptative, transitoire, rapide qui a pour but de réduire la charge protéique entrant dans le réticulum endoplasmique en diminuant la synthèse protéique. La seconde réponse adaptative est plus lente et permet d'augmenter la capacité de repliement du réticulum endoplasmique. Elle nécessite une transcription spécifique de gènes cibles de l'UPR, expliquant son caractère plus tardif. Si l'homéostasie n'est pas rétablie par ces deux

mécanismes, alors l'apoptose est induite afin de protéger l'organisme des cellules constituées de protéines aberrantes (75). L'UPR est initiée par 3 protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique, l'Inositol-Requiring Enzyme 1  $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ), l'Activating Transcription Factor-6 (ATF6) et la Protein kinase RNA(PKR)-like ER Kinase (PERK). Ces protéines sont sensibles à l'état de repliement des protéines présentes dans la lumière du RE et transmettent l'information aux protéines du cytosol (**figure 5**).

### 1) *La voie IRE1 $\alpha$*

IRE1 $\alpha$  est une protéine kinase/endoribonucléase qui en réponse à l'UPR, s'oligomérisé et subit une trans-autophosphorylation, ce qui induit l'expression de son activité endoribonucléasique. L'IRE1 $\alpha$  ainsi activée épisse l'ARNm du facteur de transcription X-Box Binding Protein 1 (XBP1), permettant le passage d'une forme XBP1u non épissée inactive à la forme épissée XBP1s contenant un domaine de transactivation (76). La voie IRE1 $\alpha$  induit la transcription de gènes impliqués dans le repliement des protéines et dans la synthèse lipidique afin d'augmenter la capacité de repliement du RE. Elle permet également la transcription des gènes du processus ER-Associated Degradation (ERAD) qui permet d'adresser les protéines mal repliées au protéasome afin d'être dégradées et ainsi diminuer la charge protéique du RE. L'activité endoribonucléasique d'IRE1 $\alpha$  lui permet également de dégrader de manière sélective les ARNm, un mécanisme appelé Regulated IRE1-Dependant Decay (RIDD) et permet un arrêt rapide du flux protéique entrant dans le RE (77) (**Figure 6**).



**Figure 5 : Diminution de la charge protéique dans le RE par l'UPR (78)**

*Lorsque la cellule subit un stress du réticulum endoplasmique la réponse adaptative unfolded protein response (UPR) est activée afin de rétablir l'homéostasie du réticulum endoplasmique. Pour cela l'UPR diminue la charge protéique du réticulum endoplasmique en réduisant la synthèse protéique et en induisant la dégradation protéique notamment par le processus ERAD.*

## 2) La voie ATF6

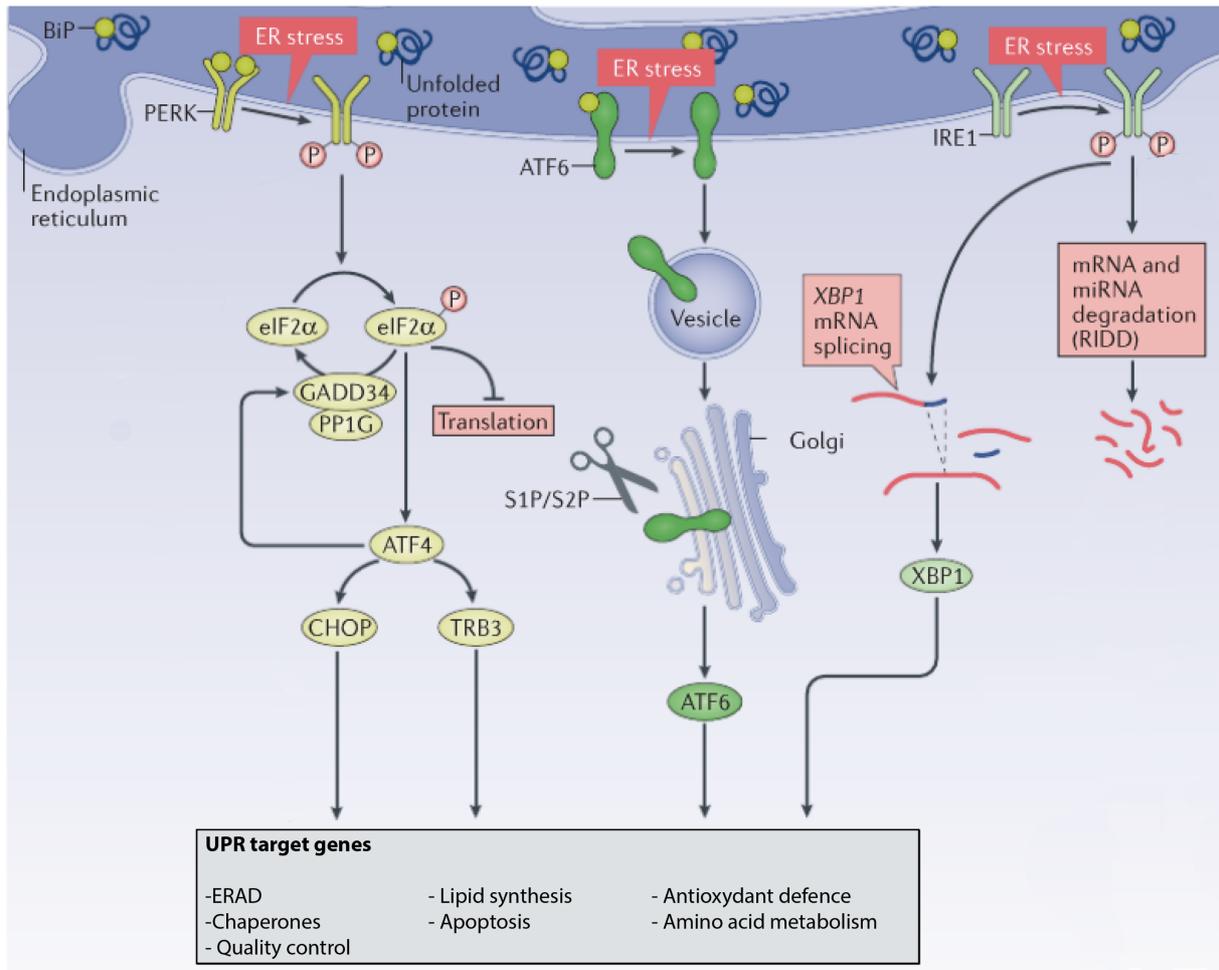
En condition homéostatique la protéine transmembranaire ATF6 est retenue sous sa forme inactive à la membrane du RE. Lors d'un stress du RE, ATF6 subit une translocation dans le Golgi où il est clivé par les protéases S1P et S2P en un fragment ATF6f de 50 kDa, qui correspond au domaine N-terminal. ATF6f est un facteur de transcription qui se fixe sur les séquences ERSE de plusieurs gènes de l'UPR relatifs à l'ERAD et au repliement des protéines (75) (**figure 6**).

### 3) *La voie PERK*

La protéine PERK, troisième voie d'activation de l'UPR, est une kinase transmembranaire avec une structure et une fonction proche de la protéine IRE1 $\alpha$ . Ces deux protéines sont expérimentalement interchangeables (79). La protéine PERK possède au niveau de sa partie cytosolique un domaine kinase qui comme IRE1 $\alpha$  est activé par trans-autophosphorylation après oligomérisation lors d'un stress du RE. L'activation de la protéine PERK entraîne une inhibition par phosphorylation de la protéine Eukaryotic Initiation Factor-2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) induisant un arrêt rapide de la traduction protéique. En effet la protéine eIF2 $\alpha$  sous sa forme active, c'est à dire non phosphorylée, est impliquée dans l'initiation de la traduction protéique. L'augmentation du ratio eIF2 $\alpha$  phosphorylé/eIF2 $\alpha$  entraîne une faible traduction protéique et réduit donc globalement la charge protéique nouvellement synthétisée à destination du RE (80). Le facteur de transcription Activating Transcription Factor 4 (ATF4) est activé par la protéine eIF2 $\alpha$  et induit la transcription du gène de la protéine C/EBP Homologous Protein (CHOP), de gènes de protéines antioxydantes, de protéines de l'ERAD et de protéines chaperonnes. La protéine CHOP régule l'entrée de la cellule en apoptose notamment par l'intermédiaire de la protéine Growth Arrest and DNA-Damage-inducible protein-34 (GADD34) qui exerce un rétrocontrôle sur phospho-eIF2 $\alpha$ . Elle permet à la protéine eIF2 $\alpha$ , par déphosphorylation de retourner à un état actif (**figure 6**).

### 4) *Mécanismes d'activation de l'UPR*

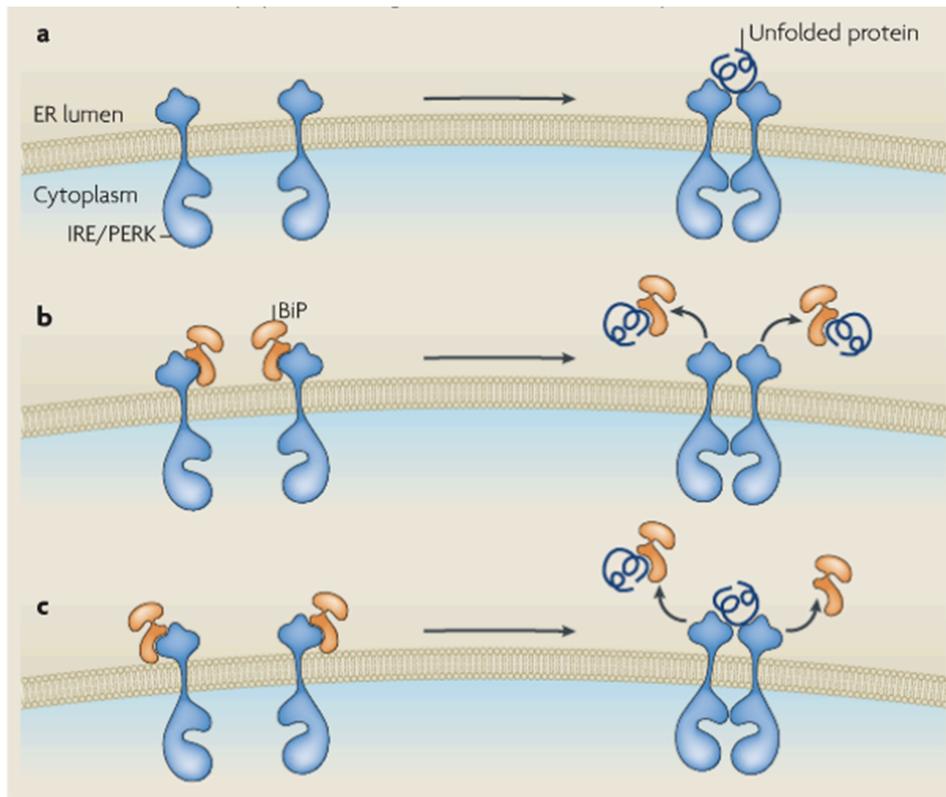
L'activation de l'UPR est donc régulée par les trois protéines transmembranaires IRE1 $\alpha$ , ATF6 et PERK. En condition physiologique ces protéines sont maintenues inactives à la membrane du RE par la protéine chaperonne Glucose Regulated Protein 78 (GRP78), aussi appelée BiP. Cette protéine exerce son action inactivatrice en se liant à la partie luminale des protéines initiateuses de l'UPR. Cette liaison permet la séquestration des protéines activateuses de l'UPR au niveau de la membrane du RE et empêche leur dimérisation (79). Cependant GRP78 présente une plus grande affinité pour les protéines mal repliées. L'accumulation de protéines mal repliées dans le RE va induire une dissociation de GRP78 des protéines activateuses de l'UPR et permettre ainsi à ces protéines de se dimériser et d'induire la transduction du signal.



**Figure 6 : Les voies de signalisation de l'UPR (78)**

*L'UPR se compose de trois voies d'activation : PERK, IRE1 $\alpha$  et ATF6. Leur activation entraîne la synthèse de gènes impliqués dans la diminution de la charge protéique, dans l'augmentation de la capacité de repliement du RE et dans l'apoptose. L'UPR entraîne également la synthèse de protéines anti-oxydantes afin de protéger la cellule contre les radicaux libres induits par le stress du RE.*

D'autres modèles d'activation ont été également proposés. En effet, les protéines IRE1 $\alpha$  et PERK présentent des homologies structurales au niveau de leur partie luminale avec les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité I (CMH-I). Cette homologie permettrait une reconnaissance des protéines mal repliées présentes dans la RE et la liaison directe de ces protéines mal repliées aux protéines IRE1 $\alpha$  et PERK entrainerait leur dimérisation et donc leur activation. Un modèle hybride a également été proposé dans lequel la dissociation de GRP78 et une liaison des protéines immatures sur IRE1 $\alpha$  ou PERK seraient nécessaires (75) (**figure 7**).



**Figure 7 : Modèles d'activation des voies IRE1 $\alpha$  et PERK**

*Modèle d'activation directe (a) la liaison directe des protéines immatures sur la séquence protéique homologue au CMH-I entraîne une dimérisation de ces protéines et l'activation de l'UPR. Modèle d'activation indirecte (b) par dissociation de la protéine GRP78 (BiP) des protéines activatrices de l'UPR causée par une plus forte affinité pour les protéines immatures. Modèle hybride (c) où la dissociation de GRP78 et la liaison des protéines immatures aux protéines activatrices de l'UPR est nécessaire.*

### C) Le devenir cellulaire

#### 1) *Modulation de l'entrée en apoptose*

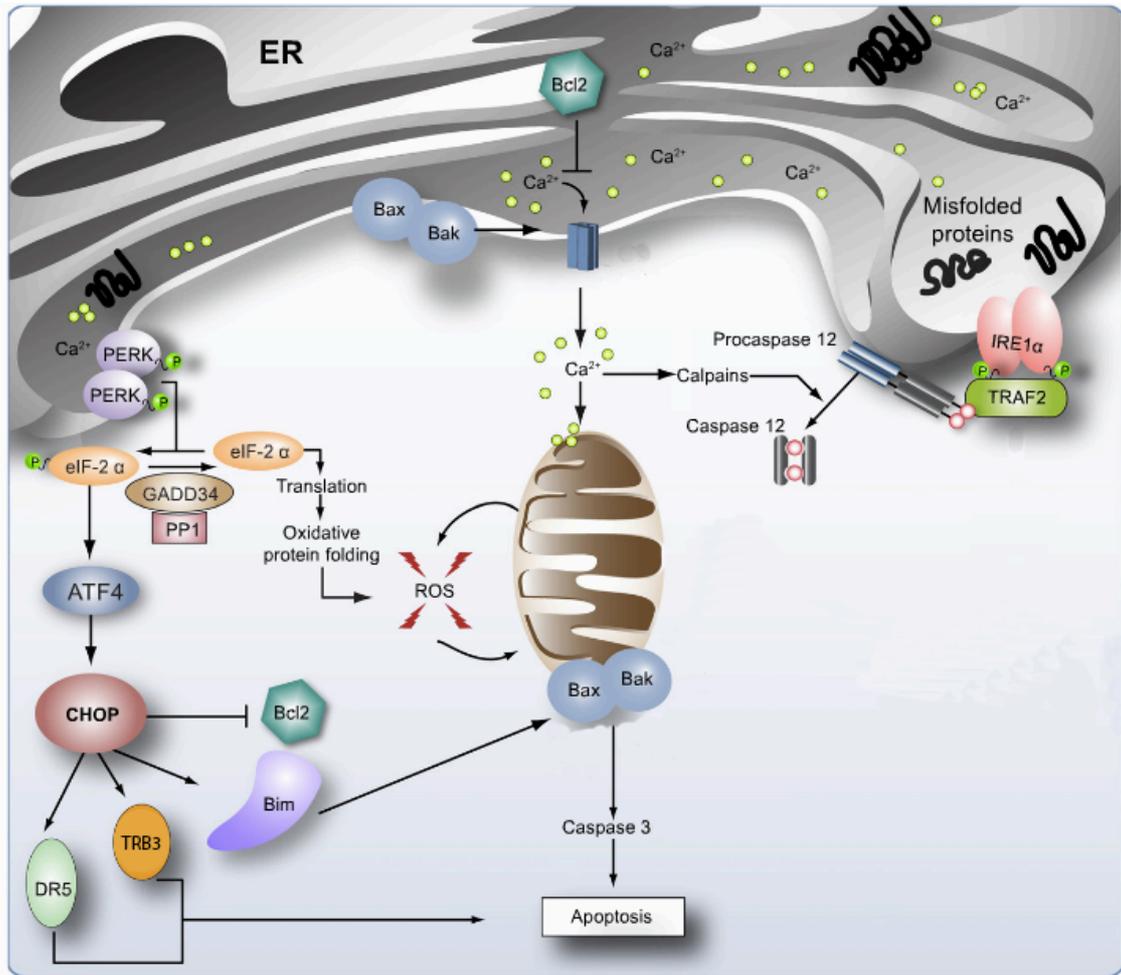
Les différentes voies de l'UPR peuvent être activées de manière indépendante, spécifique et en fonction du degré de stress du RE, ce qui permet une régulation fine de la réponse UPR mais également la fixation d'un « point de non-retour » au-delà duquel la cellule entrera en apoptose. En effet, bien que les protéines IRE1 $\alpha$  et PERK présentent une homologie structurale et fonctionnelle, leur cinétique d'activation diffère. Lors d'un stress du RE prolongé on observe une diminution de XBP1s au cours du temps alors que le signal de PERK est maintenu. Cette différence d'activation entraîne, en aval de la voie PERK, l'induction d'un

signal pro-apoptotique (73). L'effet est double, d'un côté la diminution de XBP1s va augmenter la sensibilité de la cellule au stress du RE, alors que le maintien du signal PERK va induire un stress oxydant et une protéotoxicité (81). Dans une récente étude les auteurs suggèrent par imagerie sur cellule unique, que l'apoptose n'est pas induite par un switch entre les voies IRE1 $\alpha$  et PERK mais plutôt par leur cinétique d'activation. En effet une activation précoce et rapide de XBP1s et une activation tardive et lente de ATF4 favorise la survie de la cellule. Cette cinétique permet une activation rapide des gènes en aval de XBP1s conduisant à une résolution rapide du stress du RE avec un maintien de l'inhibition de la traduction par une expression lente de GADD34 (82). La différence de cinétique entre ces deux protéines similaires s'expliquerait par des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles et/ou par liaison spécifique de protéines activatrices ou inhibitrices sur leur domaine cytosolique. La liaison de protéines régulatrices permettrait une modulation précise de la cinétique mais aussi de l'intensité de la voie UPR activée (73).

Lorsque les capacités de l'UPR à restaurer l'homéostasie du RE sont dépassées, la cellule entre en apoptose. Les détails moléculaires de ce processus sont encore mal connus. Des études suggèrent qu'un programme pro-apoptotique spécifique, impliquant particulièrement la voie PERK, est mis en jeu lorsque le stress du RE ne peut être résolu. Lors d'un stress prolongé l'activité de la voie IRE1 $\alpha$  diminue sans que celle de la voie PERK ne soit modifiée. Cette différence d'activation au court du temps va permettre à la protéine CHOP d'être surexprimée. L'activation d'ATF6 est également capable d'induire l'expression de CHOP. En effet, il existe sur le promoteur du gène *Chop* un site de liaison du facteur de transcription ATF6 différent de celui du facteur de transcription ATF4, ce qui permet une régulation précise (83). La surexpression de CHOP induit l'apoptose par différents mécanismes. Premièrement, en inhibant l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (84), CHOP augmente la sensibilité de la cellule à l'apoptose. CHOP peut également induire l'expression du facteur pro-apoptotique BIM (85). Par ailleurs, en régulant l'expression de GADD34 impliqué dans la déphosphorylation de la protéine eIF2 $\alpha$ , CHOP induit une levée de l'inhibition de la synthèse protéique et permet ainsi la synthèse de protéines requises pour l'apoptose (81). La réactivation de eIF2 $\alpha$  va entraîner une surcharge du RE qui conduit à une production de radicaux libres et à l'activation des caspases 12 et 3 induisant l'apoptose de la cellule si le stress du RE n'est pas résolu au moment de la reprise de la traduction (83).

CHOP peut également induire l'apoptose par l'intermédiaire de la protéine Tribbles-related protein 3 (TRB3). En effet, l'hétérodimérisation de CHOP avec ATF4 induit la transcription de TRB3. Cette protéine est notamment capable d'induire un rétrocontrôle en inhibant l'activité de CHOP en se liant directement à la protéine mais également en induisant la dégradation de ATF4 diminuant ainsi la transcription de CHOP. Néanmoins, lors d'un stress soutenu il a été montré que l'expression de TRB3 par CHOP induit l'apoptose par l'inhibition d'Akt, impliqué dans la survie cellulaire. De plus, l'apoptose induite par CHOP nécessite la translocation de la protéine BAX du cytosol à la mitochondrie or l'inhibition d'Akt est indispensable pour cette translocation. TRB3 agirait donc comme un régulateur de l'apoptose induite par CHOP, lors d'un stress modéré TRB3 permet un rétrocontrôle de la voie ATF4 et favorise la résolution du stress du RE. En revanche lors d'un stress soutenu la transcription de CHOP et TRB3 est maximale induisant l'entrée en apoptose de la cellule (86).

CHOP régule également l'expression d'ER Oxydoreductin 1  $\alpha$  (ERO1) et participe ainsi à l'induction d'un stress oxydant. Celui-ci induit de surcroît une inhibition de la dégradation protéique initiée par l'UPR en empêchant le transfert des protéines mal repliées au protéasome (81, 87). Enfin CHOP induirait l'expression du récepteur de mort cellulaire Death Receptor 5 (DR5) induisant l'apoptose via la caspase-8 (88). L'expression de l'ARNm de DR5 serait régulée par le niveau d'activation des voies IRE1 $\alpha$  et PERK. La voie IRE1 $\alpha$  via le processus RIDD inhibe l'expression de DR5 alors que PERK via CHOP induit la transcription de l'ARNm de DR5 qui agit comme une sonde du stress du RE. La voie PERK et la protéine CHOP jouent donc un rôle central dans le devenir de la cellule et l'activation de l'apoptose lors d'un stress du RE (**figure 8**).



**Figure 8 : Induction de l'apoptose par la voie PERK (85)**

*La protéine CHOP représente un facteur clé de l'apoptose induite par la voie PERK et est capable d'inhiber certaine protéine anti-apoptotique comme BCL-2 et d'activer des protéine pro-apoptotique comme BAX. CHOP peut également induire l'apoptose en régulant l'expression des protéine DR5 et TRB3 ou de manière indirecte en induisant un stress oxydant.*

## 2) Effet du stress du RE sur la prolifération et la migration

Plusieurs études montrent une implication spécifique de PERK dans l'arrêt du cycle cellulaire induit par l'UPR. La surexpression de PERK inhibe la traduction de la cycline D1, provoquant un arrêt du cycle cellulaire (89). Au contraire, l'expression d'un dominant négatif de PERK entraîne une atténuation de la perte de la cycline D1 et de l'arrêt du cycle cellulaire. Par ailleurs, l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire pourrait être impliquée, par un mécanisme non déterminé, dans l'initiation de l'apoptose (90). En effet, la division cellulaire nécessite d'importantes ressources énergétiques. L'arrêt du cycle cellulaire permettrait donc d'utiliser

cette ressource énergétique dans la restauration de l'homéostasie du RE avant l'initiation de l'apoptose (91).

L'effet du stress du RE sur la migration cellulaire est encore peu étudié, les principales études sur le sujet étant réalisées dans le domaine du cancer. Ainsi, une étude montre que l'activation de la voie PERK par l'hypoxie dans des cellules de cancer du sein stimule la migration de ces cellules (92).

### 3) *Le stress du RE et autophagie*

La macroautophagie (que l'on désignera sous le terme d'autophagie) est un processus de recyclage induit par différents stress notamment le stress du RE, impliquant la dégradation des constituants cellulaires par le lysosome afin de maintenir le niveau énergétique et d'assurer le contrôle qualité des protéines et des organelles. L'autophagie se caractérise par la formation d'autophagosomes provenant du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (93). L'activation de la voie PERK/eIF2 $\alpha$  conduit à la transcription de TRB3 qui, en inhibant la voie AKT/mTOR, entraîne la stimulation de l'autophagie. Parallèlement, la transcription de protéines nécessaires à la formation des autophagosomes est induite par l'activation de ATF4 et de CHOP. L'autophagie est un processus non sélectif pouvant être reprogrammé en un processus de dégradation protéique sélectif afin de cibler des composants protéiques du RE (**figure 5**). En effet, le processus d'autophagie peut être couplé avec le mécanisme ERAD et ainsi reconnaître les protéines ubiquitinées et les recycler. Ce processus permet notamment de réduire la charge protéique du RE (78). L'autophagie peut être activée de manière secondaire afin de compléter l'ERAD lorsque la charge protéique à dégrader est importante. Mais des études ont montré que l'autophagie est impliquée dans la dégradation de protéines mal repliées issues d'agrégats distincts de ceux adressés au système ERAD et également des protéines ayant une structure les protégeant partiellement de la dégradation par le protéasome (94, 95). L'autophagie et l'apoptose induites par l'UPR sont deux processus régulés principalement par la voie ATF4 et CHOP, l'autophagie étant considérée comme un mécanisme de survie. Néanmoins un haut degré de stress ou un stress prolongé peuvent conduire à une mort cellulaire induite par l'autophagie. Le processus d'ubiquitination joue un rôle clé dans la survie et l'apoptose dépendant de l'autophagie. L'ubiquitine ligase TRIM13 du RE est un acteur majeur dans cette régulation du devenir cellulaire dépendant de l'autophagie. Cette protéine

n'intervient pas dans l'UPR mais elle est impliquée dans l'activation des caspases et de l'apoptose lors d'un stress du RE (96, 97).

#### D) Le stress du RE dans les maladies du foie

Le stress du RE est impliqué dans la progression de différentes maladies chroniques, notamment les maladies chroniques du foie. Ainsi, un stress du RE a été mis en évidence lors d'une infection virale chronique par les virus de l'hépatite C ou de l'hépatite B ou bien encore lors d'une maladie hépatique alcoolique, d'ischémie, d'intoxication ou de cancer hépatique (85).

Le rôle du stress du RE a principalement été étudié dans les hépatocytes au cours des maladies métaboliques du foie (98). Une augmentation de la phosphorylation de PERK et d'eIF2 $\alpha$  a été démontrée dans le foie de souris ob/ob et de souris sous régime High Fat Diet (HFD). La phosphorylation de ces deux protéines traduit une activation de la voie PERK et donc l'existence d'un stress du RE dans des modèles murins de maladie métabolique. Une étude réalisée chez des patients obèses révèle une activation de la voie PERK dans le foie. Suite à une chirurgie bariatrique, la perte importante de poids entraîne chez ces patients une diminution de la stéatose corrélée à une diminution du stress du RE (99). Une seconde étude chez des patients atteints de NAFLD montre une augmentation de la phosphorylation de la protéine eIF2 $\alpha$  dans le foie bien que les autres marqueurs de l'UPR ne soient pas augmentés (100).

Le stress du RE est également retrouvé et étudié dans d'autres maladies du foie comme les maladies cholestatiques. Au cours de ces maladies, les acides biliaires, molécules hydrophobes et donc toxiques s'accumulent dans le foie (85). Certains acides biliaires comme le deoxycholate ou le glycochenodeoxycholique sont capables d'induire l'expression des gènes de l'UPR, et notamment CHOP, ce qui conduit à l'apoptose des hépatocytes (101-104). De plus les hépatocytes issus de souris invalidées pour le gène codant la protéine CHOP sont plus résistants à l'apoptose induite par les acides biliaires que les hépatocytes de souris sauvages (101). *In vivo* après ligature de la voie biliaire, les souris invalidées pour le gène CHOP développent des lésions hépatiques et une fibrose moins sévère. Une autre étude sur un modèle génétique de cholestase intrahépatique démontre également que l'accumulation d'acides biliaires dans le foie est associée à un stress du RE (105).

De récents travaux ont montré que l'expression de GRP78 et CHOP est plus élevée chez les patients ayant une fibrose sévère (score METAVIR 2-4) que chez les patients avec une fibrose modérée (METAVIR 0-1), quelle que soit l'étiologie de la fibrose. La progression de la fibrose vers un stade avancé est corrélée à une augmentation de l'expression de CHOP. Ce lien entre stress du RE et fibrose hépatique est également démontré dans un modèle de souris CCL4 et un modèle de souris HFD (106).

### E) Le stress du RE dans les myofibroblastes

Les maladies chroniques du foie induisent un stress du RE dans les hépatocytes. Quelques études, principalement dans des modèles *in vitro*, suggèrent que les cellules étoilées peuvent être également soumises à un stress du RE lors de ces maladies. Tout d'abord dans un modèle de Non Alcoholic Steato Hepatitis (NASH), les auteurs montrent que la lipotoxicité associée à la NASH induit *in vitro* un stress du RE dans les CEFs humaines (107). Une autre équipe a mis en évidence une augmentation d'expression des gènes associés au stress du RE dans la lignée de CEF LX-2 traitée avec le milieu de culture de cellules HepG2 infectées par le VHB (108). Par ailleurs les CEFs traitées par l'alcool *in vitro* montrent une augmentation de l'expression des protéines GRP78 et CHOP (109). De plus les CEFs isolées à partir de rats soumis à une intoxication par l'alcool, démontrent une augmentation de l'expression des protéines du stress du RE. Cette augmentation du stress du RE est également mise en évidence lors d'un stress oxydant dans des CEFs traitées avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (110).

Lors de la fibrose, l'activité de synthèse et de sécrétion protéique des myofibroblastes est fortement augmentée, ce qui pourrait conduire à un stress du RE. Des études montrent que la surcharge du RE par la synthèse de protéines de la MEC dans les CEFs induit un stress du RE qui peut conduire à l'apoptose de ces cellules (111, 112). Dans ces études les auteurs suggèrent que le stress du RE dans les myofibroblastes permettrait de limiter la fibrose et pourrait être un des mécanismes permettant la réduction du nombre de myofibroblastes lors de la phase de résolution.

D'autres études suggèrent à l'inverse que le stress du RE serait impliqué dans l'activation myofibroblastique. Ainsi, un stress du RE, induit *in vitro* par la tunicamycine, faciliterait la différenciation des fibroblastes de peau en myofibroblastes (113). Une seconde

étude, réalisée avec des myofibroblastes de peau, de poumon et des CEFs, montre que l'activation de l'UPR induit la dégradation du miR-150 ce qui conduit à l'augmentation d'expression de l' $\alpha$ SMA (114). Il a été montré, dans un modèle de souris soumises à une intoxication par l'alcool, que l'activation des CEFs était associée à une augmentation de l'expression et de la synthèse des protéines GRP78, CHOP, ATF4 et ATF6. Dans cette étude, l'inhibition de IRE1 $\alpha$  entraîne une diminution d'expression de l' $\alpha$ SMA et de Col1 et une diminution de la migration de ces cellules, suggérant un lien direct entre le stress du RE et l'activation des myofibroblastes (110). Par ailleurs, une étude a rapporté une colocalisation des marquages  $\alpha$ SMA et p-PERK dans le foie fibrotique de souris (106). Dans cette étude, les auteurs montrent que l'activation de la voie PERK conduit à une augmentation de Smad2, permettant l'activation des CEFs.

Le stress du RE dans les myofibroblastes reste encore peu étudié, mais il semble jouer un rôle bivalent dans ces cellules. D'une part il participerait à l'activation myofibroblastique des CEFs et donc à la progression de la fibrose, et d'autre part en induisant l'apoptose des myofibroblastes il pourrait favoriser sa régression. Une étude récente vient confirmer ce rôle complexe du SRE dans les myofibroblastes. Dans cette étude, les auteurs montrent que le TGF $\beta$ , en induisant l'accumulation de procollagène 1 dans le RE des CEFs, active l'UPR et que XBP1s, *via* la régulation de la protéine TANGO1, est nécessaire à la sécrétion de Col1 dans ces cellules. En revanche, la rétention du procollagène 1 dans le RE entraîne l'apoptose des CEFs médiée par l'UPR (115).

## F) Le stress du RE et l'angiogénèse

Le VEGF est l'un des facteurs pro-angiogéniques les plus importants. Sa liaison à son récepteur endothélial spécifique entraîne la libération de métallo-protéases, la prolifération et la migration des cellules endothéliales vers le stimulus angiogénique formant ainsi de nouveaux vaisseaux (116, 117).

Plusieurs études ont montré un lien entre l'UPR et l'angiogénèse et plus particulièrement entre l'UPR et le VEGF. Ainsi, une régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle et post-traductionnelle du VEGF par les voies de l'UPR a été mise en évidence (118, 119). Ces travaux montrent une augmentation de l'expression du VEGF par

différents inducteurs chimiques du stress du RE comme la tunicamycine. A contrario l'inhibition sélective des différentes voies de l'UPR diminue l'expression du VEGF. Les facteurs de transcription activés par les trois voies de l'UPR (ATF4, ATF6, XBP1s) possèdent des sites consensus sur le promoteur du VEGF et sont capables de réguler son expression (118). Une étude sur des cellules épithéliales de rein montre que l'UPR régule non seulement le VEGF mais également d'autres facteurs angiogéniques comme le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) et l'angiogénine (120). Il apparaît que la régulation du VEGF par l'UPR implique plus particulièrement la voie PERK/ATF4 (121-123). Il existe également une régulation de la traduction du VEGF par la protéine eIF2 $\alpha$  (124).

Enfin une équipe a démontré une activation des voies de l'UPR par le VEGF sur des cellules endothéliales, sans induction du stress du RE. Dans ces cellules, la fixation du VEGF à son récepteur entrainerait la phosphorylation de la phospholipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), qui en interagissant avec le complexe mTORC1, pourrait activer les voies PERK et ATF6. Dans ces cellules l'activation des voies PERK et ATF6 permet à la protéine Akt d'être complètement active et d'exercer sa fonction anti-apoptotique. Ce mécanisme permettrait aux cellules endothéliales de survivre au stress du RE durant l'angiogénèse (125).

## **IV) L'acide ursodeoxycholique (UDCA)**

### **A) Les indications cliniques de l'UDCA**

L'UDCA est largement utilisé pour le traitement des patients ayant une maladie biliaire notamment la cholangite biliaire primitive (CBP) et la cholangite sclérosante primitive (CSP) et parfois utilisé dans le traitement d'autres maladies hépatiques. Son utilisation en médecine remonte aux années 1960 mais les premières études cliniques datent de la fin des années 1980 (126). La structure chimique de l'UDCA lui confère une haute hydrophilie et donc moins d'effets toxiques que les autres acides biliaires à l'égard des membranes lipidiques. En clinique l'UDCA est administré par voie orale, absorbé par diffusion passive au niveau du jéjunum (127) et est ensuite transporté par la veine porte jusqu'aux sinusoides où il est internalisé par les hépatocytes via des transporteurs d'acides biliaires spécifiques appelés Na<sup>+</sup>-Taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp) et Organic anion-transporting polypeptide (OATP) (128). Dans les hépatocytes, l'UDCA est conjugué à la glycine et à la taurine avant d'être exporté dans

les canalicules biliaires par l'intermédiaire du transporteur Bile salt export pump (BSEP). En clinique la dose pharmacologique de l'UDCA est 10 à 15mg/kg/jour, à cette concentration l'UDCA devient l'acide biliaire prédominant dans le foie et le sérum (127). Il permet de ralentir la progression des maladies biliaires en diminuant l'inflammation, réduisant les zones de nécrose et en améliorant la prolifération ductulaire mais ne permet pas la résolution de la fibrose (129). Cependant, les effets de l'UDCA sur la fibrose sont moins importants qu'attendu compte tenu de ses effets sur la cholestase et l'inflammation.

## B) Mécanismes d'action de l'UDCA

Les effets de l'UDCA ont principalement été étudiés sur le foie *in vivo* ou sur les hépatocytes isolés en culture. L'UDCA ne représente pas plus de 4% du pool endogène d'acides biliaires chez l'homme alors qu'il peut représenter jusqu'à 60% du pool lors d'un traitement à l'UDCA. Une proportion importante d'UDCA dans la composition de la bile rend celle-ci beaucoup moins hydrophobe et donc moins cytotoxique. En effet la capacité détergente de la bile sur la membrane lipidique des cellules est corrélée à son degré d'hydrophobicité (130). Cependant, chez les patients atteints de CSP, l'administration de doses élevées d'UDCA (25 à 30 mg/kg/jour) accélère la progression de la maladie ce qui a été attribué à une transformation d'une partie de l'UDCA en acide lithocholique, un acide biliaire hydrophobe et toxique (131, 132).

L'UDCA exerce également un effet anti-apoptotique sur les cellules. Lors de maladies cholestatiques la concentration cytoplasmique en acides biliaires augmente dans les hépatocytes et, le plus souvent, également dans les cholangiocytes entraînant une apoptose ou une nécrose des cellules en fonction de la sévérité de la cholestase (133, 134).

L'apoptose peut être induite par les acides biliaires hydrophobes qui génèrent la formation de ROS (103) qui entraînent un stress du RE et l'activation de CHOP qui inhibe Bcl-2 provoquant la libération du calcium intracellulaire et l'activation de caspase-12 (**figure 8**). L'UDCA exerce son effet anti-apoptotique par différents mécanismes. Un de ces mécanismes est la diminution des radicaux libres tel que les ROS issus de l'effet détergent des acides biliaires hydrophobes sur la membrane de la mitochondrie et la surexpression d'enzymes antioxydantes endogènes (135, 136). L'UDCA agit également sur l'expression des protéines

anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 notamment en se liant au récepteur Epithelial Growth Factor (EGFR) (137), et prévient l'activation de caspase-12. De plus lorsqu'il est conjugué à la taurine pour former l'acide tauroursodeoxycholique (TUDCA), il est capable de réduire directement le stress du RE en agissant comme une protéine chaperonne (138).

L'effet détergent des acides biliaires sur la membrane lipidique des cellules provoque une nécrose par cytolysse (133). En formant un complexe avec le cholestérol de la membrane cellulaire, le TUDCA favoriserait la répulsion des charges tensioactives des acides biliaires protégeant ainsi les cellules de la cytolysse. Cependant pour obtenir cet effet, la concentration nécessaire de TUDCA doit être de l'ordre du millimolaire, très supérieur à la concentration sanguine du TUDCA qui au cours des traitements, est de l'ordre du micromolaire. Néanmoins, cette concentration peut être atteinte dans la bile (139) et serait particulièrement protecteur dans les maladies biliaires causées par un défaut d'ABCB4, le transporteur canaliculaire de phospholipides. Dans ces maladies, le déficit de phospholipides dans la bile augmente la quantité d'acides biliaires extra-micellaires, aux effets détergents à l'égard de la membrane lipidique des cholangiocytes (139).

La composition en acides biliaires joue un rôle clé dans la cytotoxicité de la bile de même que les concentrations intracellulaires d'acides biliaires. Le flux intracellulaire des acides biliaires est dépendant de transporteurs membranaires et d'enzymes de synthèse pouvant être modulé par l'UDCA.

En effet, chez la souris l'UDCA diminue l'expression du transporteur basolatéral Oatp1, qui contribue à l'entrée des acides biliaires dans les hépatocytes, et d'augmenté par un mécanisme traductionnel l'expression des pompes d'efflux Multidrug Resistance associated Protein 3 (MRP3) et 4 (MRP4) permettant l'excrétion des acides biliaires au pôle basolatéral. Cependant l'UDCA n'a pas d'effet sur l'expression du transporteur Ntcp le principal transporteur assurant la captation hépatocytaire des acides biliaires (140). L'UDCA agit également sur le tubule rénal où il induit la surexpression des pompes d'efflux MRP2 et MRP4 et où il réprime l'expression du transporteur Apical Sodium dependent Bile Salt transporter (ASBT) impliqué dans la réabsorption tubulaire des acides biliaires. L'ensemble de ces régulations favorise l'excrétion des acides biliaires dans les urines (141, 142). L'UDCA est également capable d'induire la surexpression de la pompe d'efflux hépatocellulaire BSEP, principal transporteur canaliculaire des acides biliaires conjugués et MRP2 également impliqué

dans la sécrétion des acides biliaires. La sécrétion canaliculaire d'acides biliaires génère ainsi un flux osmotique expliquant l'effet délétère de l'UDCA chez les patients atteints par une obstruction des voies biliaires. En effet, l'UDCA entraîne alors une sécrétion de bile en amont d'un obstacle, ce qui augmente la pression et la concentration d'acides biliaires associé à leur action cytotoxique (143, 144). Ce flux intracellulaire d'acides biliaires modifie l'expression des transporteurs d'acides biliaires, lorsque le flux biliaire diminue l'expression des pompes d'efflux à la membrane des hépatocytes diminue également. Cependant, en stimulant la sécrétion de la bile l'UDCA augmente l'expression à la membrane des différentes pompes d'efflux permettant ainsi de diminuer la concentration intracellulaire en acides biliaires et leurs effets cytotoxiques (145). En plus d'induire la sécrétion de la bile, l'UDCA est également capable de stimuler la sécrétion d'ions  $\text{HCO}_3^-$  qui agit comme une barrière de protection à la membrane lipidique des cholangiocytes en repoussant les molécules chargées négativement (146).

L'inflammation est une composante importante des maladies biliaires particulièrement dans les maladies d'origine auto-immune. L'UDCA a des propriétés immunomodulatrices en régulant notamment l'expression des molécules d'adhésion, la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (147). Cependant, il a aussi été montré dans les cellules de Kupffer et les monocytes que l'UDCA n'a pas d'effet sur la sécrétion de cytokines induite par les lipopolysaccharides (LPS) (148).

En résumé, l'UDCA et ses conjugués principalement le TUDCA, permettent de diminuer la mort cellulaire en limitant le stress oxydant, l'induction d'un stress du RE et en modulant l'activation des protéines de la famille Bcl-2 impliquées dans l'apoptose. Il limite également l'effet cytolytique des acides biliaires hydrophobes et augmente la sécrétion des acides biliaires. L'UDCA peut également moduler l'inflammation.

### C) Effet de l'UDCA sur le stress du RE

Une étude sur les cellules cancéreuses a montré que l'inhibition du stress du RE par le TUDCA diminue le pouvoir invasif des cellules cancéreuses sans modifier leur migration, leur prolifération ou leur viabilité. L'effet sur l'invasion serait dû à une diminution de la sécrétion de certaines métallo-protéinases matricielles via l'inhibition de la voie PERK (149).

L'UDCA réprime l'activation des trois voies de l'UPR, élevant ainsi le seuil de sensibilité au stress du RE des cellules ce qui diminue l'induction de l'apoptose (150). Dans les cellules HepG2, le TUDCA serait capable de diminuer l'agrégation des protéines et donc de limiter l'apparition d'un stress du RE provoqué par une exposition aux ultraviolets ou par un inducteur chimique, la tunicamycine. Celui-ci induirait l'activation de la voie PERK ce qui limiterait l'accumulation des protéines dans le RE et préviendrait ainsi la survenue d'un stress du RE. Cet effet n'est pas dû à une interaction membranaire mais nécessite l'entrée du TUDCA dans la cellule, or les HepG2 n'expriment pas le principal transporteur responsable de l'entrée intracellulaire des acides biliaires. En revanche, ces cellules expriment le transporteur OATP qui permet l'entrée de 7% du TUDCA, ce qui explique les fortes concentrations utilisées. Le TUDCA prévient l'agrégation des protéines en se liant à leur région hydrophobe. Cependant, cette liaison ne prévient pas la dénaturation des protéines. Les protéines sont donc stabilisées mais dans un état mal replié entraînant une réponse UPR et l'activation de PERK ce qui va diminuer la charge protéique et induire les mécanismes anti-apoptotiques (151).

Ces résultats montrent que l'UDCA et ses conjugués peuvent moduler le stress du RE dans les cellules hépatiques lors de maladies chroniques du foie.

#### D) Effet de l'UDCA sur les myofibroblastes

Les effets potentiels de l'UDCA sur les myofibroblastes sont peu connus. Selon une étude (152), l'administration *in vitro* d'UDCA, à une concentration proche de celle retrouvée dans le foie de patients traités par UDCA, ne modifie pas la prolifération des CEFs myofibroblastiques alors qu'à une dose 5 à 10 fois plus importante, l'UDCA diminue la prolifération ces cellules, ce qui est dû à un effet cytotoxique. *In vivo* dans un modèle murin de stéatohépatite non alcoolique, l'administration d'UDCA à une dose thérapeutique entraîne une diminution du nombre de CEFs myofibroblastiques et de l'expression intrahépatique du TGF- $\beta$ . L'UDCA ralentirait la progression de la fibrose en diminuant le TGF- $\beta$  sécrété par les cellules de Kupffer (152). Il a été rapporté que les acides biliaires pouvaient induire *in vitro* la prolifération des CEFs myofibroblastiques sans modifier l'expression du Col1 ou du TGF- $\beta$  mais augmentaient leur prolifération (153). En effet, les acides biliaires induiraient une augmentation du nombre de CEFs myofibroblastiques en phase S du cycle cellulaire par une augmentation de la quantité de cycline E, via les voies Extracellular signal-regulated kinase 1/2

(ERK1/2) et P70S6K, et une activation du récepteur EGF par les acides biliaires (153). L'activation du récepteur EGF par les acides biliaires a aussi été observée dans les hépatocytes et les cholangiocytes. Les acides biliaires pourraient agir sur le récepteur EGF de manière dépendante ou indépendante des ligands (137, 154-156). La résistance des CEFs à l'apoptose induite par les acides biliaires peut s'expliquer par l'absence de transporteurs d'acides biliaires notamment de NTCP et OATP. Les CEFs expriment seulement faiblement le transporteur OATP3 ce qui ne suffit pas pour que la concentration intracellulaire en acides biliaires induise l'apoptose des CEFs. De plus les voies intracellulaires impliquées dans la prolifération induite par les acides biliaires dans les CEFs sont également impliquées dans la protection contre l'apoptose (153). Ces différents résultats mettent en évidence des discordances sur l'action de l'UDCA sur les CEFs. Le mode d'action et les effets de l'UDCA sur les myofibroblastes méritent donc encore d'être clarifiés.

## **Objectifs des travaux de thèse**

Le stress du RE est impliqué dans les lésions des hépatocytes au cours de la fibrose, mais il existe peu de données sur le rôle du stress du RE dans les myofibroblastes. Nous avons émis l'hypothèse que les myofibroblastes portaux étaient soumis à un stress du réticulum endoplasmique lors de la fibrose hépatique capable de moduler leurs fonctions cellulaires. Ce travail de thèse a eu pour objectifs de :

- Caractériser le modèle des myofibroblastes portaux isolés.
- Déterminer si les myofibroblastes portaux sont soumis à un stress du réticulum endoplasmique lors de la fibrogenèse d'origine biliaire.
- Déterminer l'effet du stress du RE réticulum endoplasmique sur les caractéristiques et les fonctions des myofibroblastes portaux.
- Déterminer l'effet de l'acide ursodeoxycholique considéré comme une molécule chaperonne, sur le stress du réticulum endoplasmique dans ces cellules.

Deuxième partie :

# Résultats

## **I) Caractérisation du modèle cellulaire de MFPs de rat**

### **A) Introduction**

L'utilisation de modèles *in vitro* contribue largement à une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la fibrose. Ainsi, la mise au point du modèle de culture des CEFs myofibroblastiques a permis d'étudier très précisément les mécanismes d'activation et la biologie de ces cellules.

Des myofibroblastes hépatiques ne dérivant pas des CEFs ont été obtenus en culture, dans notre laboratoire et par d'autres équipes, avec des approches différentes. Nous décrivons dans cet article le protocole que nous utilisons pour obtenir des myofibroblastes portaux à partir de segments de canaux biliaires. Cette méthode standardisée nous permet d'obtenir des MFPs que nous avons bien caractérisés, et l'utilisation de ce modèle a contribué à approfondir nos connaissances sur cette sous-population de myofibroblastes hépatiques (Kinnman 2003, Bosselut 2010, Lemoine 2015). Ce travail devait permettre de caractériser l'évolution de l'expression des marqueurs des MFPs au cours des différents temps de culture et d'analyser l'évolution en culture de ces cellules en particulier la prolifération.



# Culture Model of Rat Portal Myofibroblasts

Haquima El Mourabit<sup>1†</sup>, Emilien Loeuillard<sup>1†</sup>, Sara Lemoine<sup>1,2</sup>, Axelle Cadoret<sup>1</sup> and Chantal Housset<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche Saint-Antoine, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR\_S 938, Paris, France, <sup>2</sup> Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Centre de Référence Maladies Rares des Maladies Inflammatoires des Voies Biliaires, Service d'Hépatologie, Paris, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Ralf Weiskirchen,  
RWTH University Hospital Aachen,  
Germany

### Reviewed by:

Soeren Volker Siegmund,  
Klinikum Konstanz, Germany  
Martin Roderfeld,  
Justus-Liebig-University Giessen,  
Germany

### \*Correspondence:

Chantal Housset  
chantal.housset@inserm.fr

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work.

### Specialty section:

This article was submitted to  
Gastrointestinal Sciences,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

**Received:** 20 January 2016

**Accepted:** 17 March 2016

**Published:** 31 March 2016

### Citation:

El Mourabit H, Loeuillard E,  
Lemoine S, Cadoret A and  
Housset C (2016) Culture Model of  
Rat Portal Myofibroblasts.  
Front. Physiol. 7:120.  
doi: 10.3389/fphys.2016.00120

Myofibroblasts are matrix-producing cells with contractile properties, usually characterized by *de novo* expression of alpha-smooth muscle actin, that arise in fibrotic diseases. Hepatic stellate cells (HSCs), known as perisinusoidal cells containing auto-fluorescent vitamin A, are the major although not exclusive source of myofibroblasts in the injured liver. Portal myofibroblasts (PMFs) have been defined as liver myofibroblasts derived from cells that are distinct from HSCs and located in the portal tract. Here, we describe the protocol we have established to obtain rat PMFs in culture. In this method, the biliary tree is (i) separated from the liver parenchyma by *in situ* enzymatic perfusion of the liver, (ii) minced and further digested *in vitro*, until bile duct segments are isolated by sequential filtration. Bile duct isolates free of HSC contaminants, form small cell clusters, which initially comprise a large majority of epithelial cells. In culture conditions (fetal bovine serum) that provide a growth advantage to mesenchymal cells over epithelial cells, the epithelial cells die and detach from the substrate, while spindle-shaped cells outgrow from the periphery of the cell clusters, as shown by video-microscopy. These cells are highly proliferative and after 4–5 days, the culture is composed exclusively of fully differentiated myofibroblasts, which express alpha-smooth muscle actin and collagen 1, and secrete abundant collagen. We found no evidence for epithelial-mesenchymal transition, i.e., no co-expression of alpha-smooth muscle actin and cytokeratin at any stage, while cytokeratin becomes undetectable in the confluent cells. PMFs obtained by this method express the genes that were previously reported to be overexpressed in non-HSC or portal fibroblast-derived liver myofibroblasts as compared to HSC-derived myofibroblasts, including the most discriminant, collagen 15, fibulin 2, and Thy-1. After one passage, PMFs retain the same phenotypic features as in primary culture. In conclusion, this straightforward and reproducible method of PMF culture, can be used to identify new markers of PMFs at different stages of differentiation, to compare their phenotype with those of HSC-MFs and ultimately determine their progenitors and specific functions in liver wound-healing.

**Keywords:** alpha-smooth muscle actin, bile ducts, collagen-type XV-alpha 1, cytokeratin 19, fibulin 2, liver fibrosis, liver digestion, portal tract

## INTRODUCTION

Myofibroblasts are cells that arise in fibrotic diseases. They are matrix-producing cells with contractile properties, characterized by *de novo* expression of proteins shared with smooth muscle cells. Myofibroblasts form a heterogeneous population of cells with different possible origins. Alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) is their most commonly used marker (Hinz et al., 2012). Hepatic stellate cells (HSCs) have been identified as the major source of myofibroblasts in the injured liver (Friedman, 2008), in particular by studies of cell lineage tracing (Mederacke et al., 2013). HSCs are recognized in their quiescent state, as vitamin A-storing cells located in the perisinusoidal space of Disse. However, culture studies and *in situ* studies of fibrotic livers have provided evidence to indicate that liver myofibroblasts could also derive from cells that are distinct from HSCs and located in the portal area (Cassiman et al., 2002; Uchio et al., 2002; Kinnman et al., 2003; Beaussier et al., 2007; Li et al., 2007). Today, we refer to this sub-population of liver myofibroblasts as portal myofibroblasts (PMFs) (Lemoine et al., 2013). Cells called portal fibroblasts have also been described. They are periductal  $\alpha$ -SMA-negative fibroblastic cells found in the normal liver, that express ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (ENTPD2) (Tuchweber et al., 1996; Dranoff et al., 2002). There is evidence to indicate that portal fibroblasts can become activated, i.e., myofibroblastic, in biliary-type liver fibrosis. However, this does not mean that PMFs all derive from portal fibroblasts. In fact, the progenitor cells of PMFs have not been identified yet. To a large extent, our knowledge regarding PMFs is based on a rat culture model that we previously established (Kinnman et al., 2003; Bosselut et al., 2010). In this model, PMFs are obtained by outgrowth from bile duct preparations. We showed that PMFs obtained by this method expressed a number of genes at higher levels than HSC-derived myofibroblasts (HSC-MFs) (Lemoine et al., 2015). This included fibulin 2 and other genes such as Thy-1, gremlin 1, and fibronectin 1 that were also found by others to be overexpressed in non-HSC derived liver myofibroblasts as compared to HSC-MFs (Knittel et al., 1999; Ogawa et al., 2007; Dudas et al., 2009). This also included the most discriminant marker of non-HSC derived myofibroblasts identified so far, with the highest expression ratio relative to HSC-MFs, i.e., collagen-type XV-alpha 1 (COL15A1).

Non-HSC derived liver myofibroblasts were previously obtained in culture, by different methods of cell isolation. The so-called rat liver myofibroblasts were isolated by enzymatic digestion of the liver, followed by separation of non-parenchymal cells by density gradient and purification of a fraction enriched in myofibroblast precursors by elutriation (Knittel et al., 1999). Vitamin A-free cells were also isolated from a stellate cell-enriched fraction of normal rat liver by fluorescence-activated cell sorting (FACS) (Ogawa et al., 2007). Cells

that were negative for ultraviolet-autofluorescence of vitamin A were thus obtained by FACS and formed myofibroblasts in culture, with distinctive features compared to HSC-MFs. Another method has been described (Kruglov et al., 2002) and subsequently modified (Wen et al., 2012), to isolate cells assumed to be portal fibroblasts, from rat liver. First, the biliary tree is prepared by enzymatic digestion of the liver and isolated cells presumably enriched in portal fibroblasts, obtained by size-based filtration. Two markers of portal fibroblasts have been reported, ENTPD2, which is lost after myofibroblastic differentiation in culture, and elastin, which is maintained.

None of these methods, has yet allowed to clearly identify the progenitor cells distinct from HSCs that contribute to liver myofibroblasts, their fate and functions, compared to those of HSC-MFs in liver tissue repair. The advantage of our model is that (i) the outgrowth of myofibroblasts reproduces the pattern of fibrosis progression from the portal area toward the lobule observed *in vivo*; (ii) portal progenitors are not dissociated from their initial niche, avoiding cell selections; (iii) the protocol, phenotype and markers of myofibroblasts obtained by this method, are all very reproducible. The limitations are the abundance of contaminant bile duct epithelial cells in the initial preparation, and possibly, a diversity of myofibroblast progenitor cells. This protocol can be used to identify new markers of PMFs at different stages of differentiation, to compare the behavior and functions of these cells with those of HSC-MFs and determine their interactions with HSC-MFs.

## MATERIALS AND EQUIPMENT

*N.B.* European catalog numbers (Cat. No.) are provided.

### Animals

Sprague Dawley rats weighing 150–200 g (Janvier Labs). Different strains (e.g., Wistar) can be used. The protocol is optimal when rats body weight is  $\leq 250$  g. Animals were housed under specific pathogen free conditions (PHEA, agreement No: B 75-12-01).

### Enzymes/Chemicals

- Betadin<sup>®</sup>
- Bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich Cat. No. A7030)
- Collagenase P (Sigma-Aldrich Cat. No. 11 213 873 001)
- DNase (Sigma-Aldrich Cat. No. DN25 > 400 units/mg)
- EDTA 0.5 mol/L pH 8.0 (Sigma-Aldrich Cat. No. 03690)
- Hyaluronidase (Sigma-Aldrich Cat. No. H3884 type IV-S750 3000 units/mg)
- Pronase (Roche Cat. No. 11 459 643 001)
- Sodium heparin (5000 IU/ml)
- Sodium pentobarbital (CEVA animal healthy 5.47 g/100 ml)

### Culture Media

- DMEM (Sigma-Aldrich Cat. No. D6046)
- Fetal Bovine Serum (FBS, GIBCO Invitrogen Cat. No. 10270-098)
- HBSS with MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub> (GIBCO Invitrogen Cat. No. 24020-022)

**Abbreviations:**  $\alpha$ -SMA, alpha-smooth muscle actin; CK, cytokeratin; COL, collagen; D, day; ENTPD2, ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2; H, hour; Hep, hepatocyte; HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; HSC, Hepatic stellate cell; NS, not significant; PMF, portal myofibroblast.

- HBSS without MgCl<sub>2</sub> or CaCl<sub>2</sub> (GIBCO Invitrogen Cat. No. 14170-088)
- Hepes (GIBCO Invitrogen Cat. No. 15630)
- L15 Leibovitz medium (Sigma-Aldrich Cat. No. L5520)
- MEM with Earl's without glutamin (GIBCO Invitrogen Cat. No. 21090-022)
- NaCl solution (9 g/L) (OTEC Cat. No. 600502)
- Penicillin/streptomycin (GIBCO Invitrogen Cat. No. 15140-122)

## Equipment

- 12-well plates
- 16 gauge X 50 mm IV catheter (Jelco Cat. No. 4012)
- Bottle-top filter 0.22 μm (Thermo scientific Cat. No. 568-0020)
- Bubble trap (Medi-Globe Cat. No. 200927)
- Cell strainer 40 and 100 μm Nylon (Falcon Cat. Nos. 352340 and 352360)
- Cotton and linen threads
- Falcon tubes 50 mL
- Glass beakers 250 mL
- Heat lamp
- Orbital water bath
- Perfusion line (Masterflex Cat. No. 96410-16)
- Perfusion pump (Masterflex Cat. No. 751800)
- Plate with magnetic stirrer
- Refrigerated (+4°C) bench-top centrifuge
- Schott Pyrex bottles 150, 250, and 500 mL
- Sterile filter for syringe (0.22 μm)
- Sterile Petri dishes
- Sterile pipettes 5, 10, 25 mL
- Sterilized fork and scissors
- Syringes 3 and 50 mL
- Water bath

## Reagent Set-Up

- Dilute pentobarbital at 1/10 in NaCl solution.
- EDTA solution (19 mg/L): Prepare the solution by dissolving 6.5 mL EDTA in 43.5 mL sterile water and filter through a 0.22-μm syringe filter. This solution can be prepared up to 4 weeks in advance and stored at +4°C.
- L15 1% Hepes solution: Under sterile condition, dilute 5 mL Hepes (1 mol/L) in 500 mL L15 medium.
- Wash solution (HBSS without MgCl<sub>2</sub> or CaCl<sub>2</sub>, 1% EDTA): Dilute 2 mL of 19-mg/L EDTA solution in 200 mL HBSS without CaCl<sub>2</sub> or MgCl<sub>2</sub>. Adjust the pH to 7.35–7.40 and filter it through 0.22-μm bottle-top filter.
- Enzyme solution 1: Add 15 mg collagenase P in 200 mL HBSS with MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub>. Place the mixture on a magnetic shaker until dissolution and adjust the pH to 7.35–7.40 and filter it through 0.22-μm bottle-top filter.
- Enzyme solution 2. In 200 mL MEM, dissolve 15 mg collagenase P, 140 mg pronase, 13 mg DNase and 200 mg BSA. Supplement with 1% penicillin/streptomycin, 1% Hepes and 3% FBS. Place the mixture on a magnetic shaker until dissolution, adjust the pH to 7.35–7.40 and filter it through 0.22-μm bottle-top filter.

- Enzyme solution 3. In 100 mL MEM, dissolve 6 mg collagenase P, 20 mg hyaluronidase, 6 mg DNase and 100 mg BSA. Supplement with 1% penicillin/streptomycin, 1% Hepes and 3% FBS. Place the mixture on a magnetic shaker until dissolution, adjust the pH to 7.35–7.40 and filter it through 0.22-μm bottle-top filter.
- Complete DMEM: Supplement DMEM with 1% penicillin/streptomycin, 1% Hepes and 10% FBS.

▲ CRITICAL Wash and enzyme solutions should be prepared no later than 18 h before starting the isolation procedure.

## Equipment Set-Up

Fill perfusion line and bubble trap with wash solution and adjust the flow rate of perfusion pump at 10 mL/min.

## PROCEDURE

### Procedure Set-Up (60 min)

Described in Section Reagent Set-Up and Equipment Set-Up.

▲ CRITICAL Wash solution and enzyme solution 1 should be preheated in the water bath (38°C).

### *In situ* Digestion of Rat Liver (90 min)

- 1- Anesthetize the rat according to the institutional approved animal protocol. We perform pentobarbital intra-peritoneal injection (1 mL/100 g body weight).
- 2- Shave the abdomen and clean with Betadin<sup>®</sup>.
- 3- Immobilize the rat by the upper and lower extremities on a dissecting board.
- 4- Perform a laparotomy to expose the liver, and move the visceral organs to the right side to expose the inferior vena cava and the portal vein.
- 5- Ligate the gastro-duodenal vein with a cotton thread. Then, prepare two linen threads around the portal vein under the gastro-duodenal vein, not to ligate at this stage. Prepare also a linen thread around the infrahepatic vena cava above the renal vein, not to ligate at this stage.
- 6- Inject 500 IU heparin in the femoral vein.
- 7- Place a 16-gauge catheter into the portal vein, entering under the gastro-duodenal vein. Check the position of the catheter that should not point upward in the vein, and ligate the two linen threads around the catheter placed in the portal vein. ! Troubleshooting (**Table 1**).
- 8- Start the pump, connect the catheter to the perfusion line and stabilize the set-up to avoid exit of the catheter. ▲ CRITICAL STEP Before connecting the perfusion line, make certain that no bubbles are introduced in the catheter, which would result in improper digestion.
- 9- Section the infrahepatic vena cava beneath the unligated linen thread that was prepared in step 5.
- 10- Place a 16-gauge catheter through the right auricle into the suprahepatic vena cava and fix it with a linen thread.
- 11- Ligate the infrahepatic vena cava by using the linen thread that was prepared in step 5. Thereafter, perfused solutions will outflow through the auricle catheter (**Figure 1A**).

TABLE 1 | Troubleshooting.

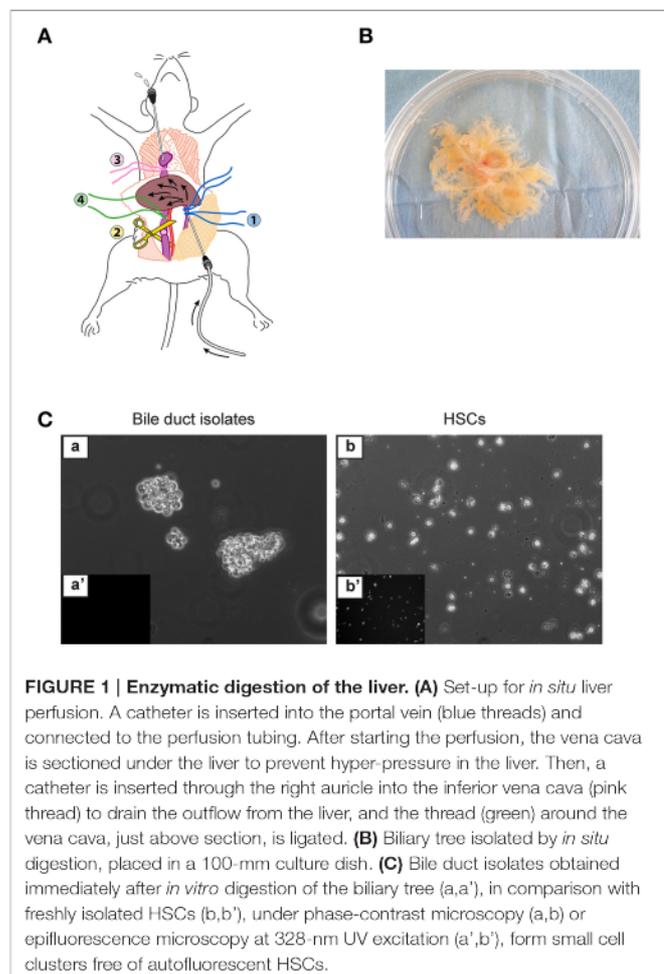
Step	Problem	Possible reason	Solution
7	Catheter exit from the portal vein	Abrupt manipulation	Inverse perfusion direction by placing the catheter in the right auricle and use it for perfusion; linen threads around the portal vein are removed to allow outflow
14	Catheter exit from the explanted liver	Abrupt manipulation	Inject L15 medium through the liver capsule using a syringe
23	Tan color of hepatocytes visible in preparations remaining on the 40- $\mu$ m cell strainer	Contamination during filtration steps	Increase the number of filtration through 40- $\mu$ m cell strainers
25	Low purity (contaminating hepatocytes)	Incomplete digestion	Make sure that the enzyme concentrations are correct Make sure that all liver lobules are perfused

- 12- Perfuse the liver with wash solution for a total of 20 min. Switch on the heat lamp directed toward the rat liver to maintain a temperature of 37°C and hydrate the liver with NaCl solution during perfusion. **▲ CRITICAL STEP** Make sure that all liver lobules are perfused. If it was not the case, you can gently move the catheter.
- 13- Switch from wash solution to enzyme solution 1 and perfuse the liver for 15–20 min, until digestion becomes visible.
- 14- Disconnect the perfusion line from the catheter but do not remove the intra-portal catheter from the liver. Explant the liver and place it in a sterile 100-mm Petri dish. Inject 20 mL of cold L15 medium (+4°C) with a syringe through catheter to dislocate hepatocytes, and repeat this injection twice. **!** Troubleshooting (**Table 1**).
- 15- Under cell culture hood, transfer the liver to a new sterile 100-mm Petri dish with L15 medium at room temperature. Peel off the liver capsule and detach the liver parenchyma by scrubbing with a fork, until the biliary tree is isolated (**Figure 1B**).

### **In vitro** Biliary Tree Digestion (150 min)

**▲ CRITICAL** Enzyme solutions 2 and 3 should be preheated in the water bath (38°C).

- 16- Transfer the biliary tree to a 100-mm sterile Petri dish containing pre-warmed enzyme solution 2. Cut the biliary tree into small pieces with scissors and transfer the minced biliary tree into a 250-mL Schott Pyrex bottle. Add enzyme solution 2 to a final volume of 100 mL and place the bottle in an orbital water bath at 37°C. Shake the bottle during 30 min. **▲ CRITICAL STEP** The result of mincing should be a homogeneous preparation of very small fragments.
- 17- Filter this preparation through a 100- $\mu$ m cell strainer and then through a 40- $\mu$ m cell strainer. Discard the filtrate from the 40- $\mu$ m cell strainer.
- 18- Suspend the preparations remaining on the 100- $\mu$ m and 40- $\mu$ m cell strainers in 100 mL of enzyme solution 2. Place the mixture under shaking at 37°C, for 30 min. **▲ CRITICAL STEP** Increase the digestion time if chunks are visible.
- 19- Repeat step 17.
- 20- Suspend the preparations remaining on the 100 and 40- $\mu$ m cell strainers in 100 mL of enzyme solution 3. Place the mixture under shaking at 37°C for 30 min. **▲ CRITICAL**
- 21- Filter the mixture through a 100- $\mu$ m cell strainer and collect the filtrate for two additional filtrations, each time with a new 100- $\mu$ m cell strainer.
- 22- Subject the filtrate obtained in step 21 to filtration through a 40- $\mu$ m cell strainer. Discard the filtrate.
- 23- Suspend the preparation remaining on the 40- $\mu$ m cell strainer in L15 medium. Proceed to a last filtration



**FIGURE 1 | Enzymatic digestion of the liver. (A)** Set-up for *in situ* liver perfusion. A catheter is inserted into the portal vein (blue threads) and connected to the perfusion tubing. After starting the perfusion, the vena cava is sectioned under the liver to prevent hyper-pressure in the liver. Then, a catheter is inserted through the right auricle into the inferior vena cava (pink thread) to drain the outflow from the liver, and the thread (green) around the vena cava, just above section, is ligated. **(B)** Biliary tree isolated by *in situ* digestion, placed in a 100-mm culture dish. **(C)** Bile duct isolates obtained immediately after *in vitro* digestion of the biliary tree (a,a'), in comparison with freshly isolated HSCs (b,b'), under phase-contrast microscopy (a,b) or epifluorescence microscopy at 328-nm UV excitation (a',b'), form small cell clusters free of autofluorescent HSCs.

**STEP** Exceeding 40 min of incubation may result in a poor yield of bile duct segments.

through a 40- $\mu$ m cell strainer and discard the filtrate. ! Troubleshooting (Table 1).

- 24- Suspend the preparation remaining on the 40- $\mu$ m cell strainer in 50 mL complete DMEM and transfer it into a 50-mL Falcon tube.

## Cell Culture

- 25- Centrifuge at 1900 rpm during 8 min at room temperature. Discard the supernatant. Suspend the cell pellet in complete DMEM and plate the cells in 12-well culture dishes (1 mL/well). The yield of cell clusters is 7000–10,000 per rat liver. ▲ CRITICAL STEP The volume of complete DMEM should be adapted to the size of the cell pellet so as to obtain four to six cell clusters per microscope field at magnification x10. Perform microscope observation under 328-nm UV excitation to exclude contamination by HSCs (Figure 1C). ! Troubleshooting (Table 1).
- 26- Maintain cell culture at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Replace the culture medium 24 h after seeding and every 48 h, thereafter. Generally, cells are confluent after 4–5 days in primary culture, a stage we refer to as passage 0 (P0).
- 27- Confluent cells can undergo several passages. They are fully differentiated in myofibroblasts, in primary culture (P0) and after one passage (P1).

## RESULTS

### Methods Used to Characterize PMF Culture

#### Culture

##### RT-PCR

Total RNA was used to prepare cDNA. Quantitative real-time PCR was performed using Sybr Green Master Mix on a Lightcycler 96 (Roche). Target gene mRNA levels were reported relative to a calibrator according to the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method with hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (*Hprt*) used as the reference gene. Primer sequences are provided in Supplementary Table 1.

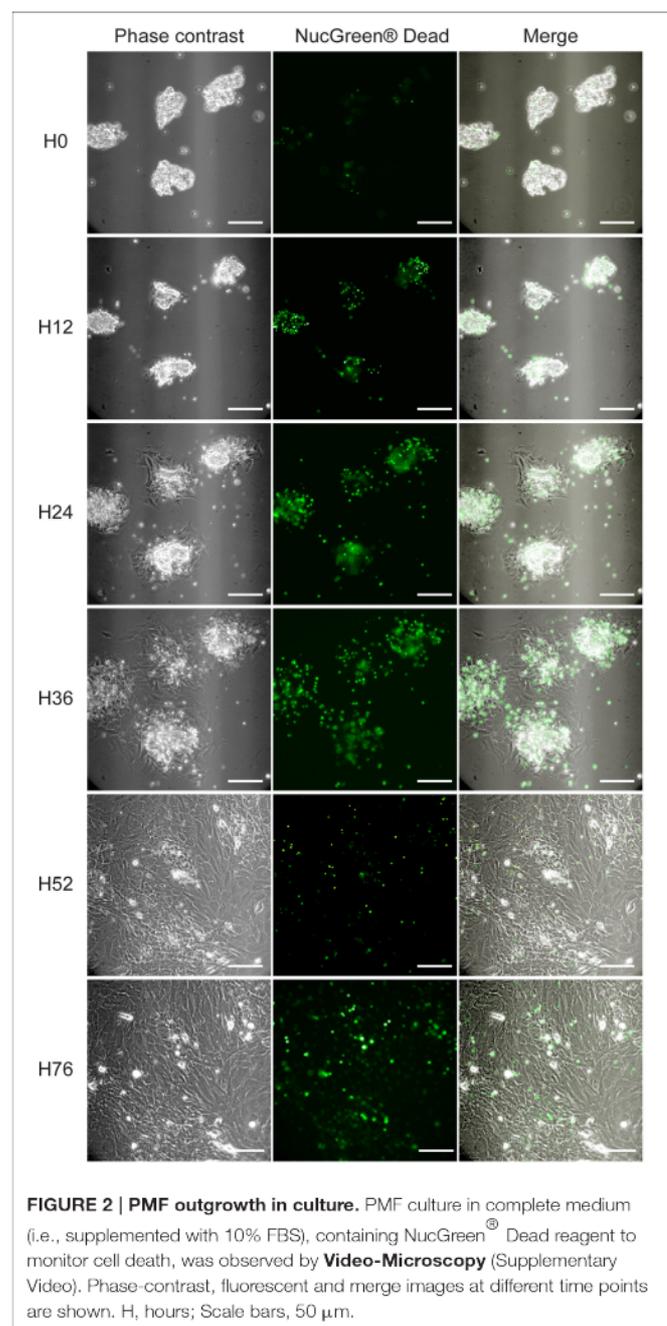
#### Fluorescence

To monitor cell viability in culture, NucGreen<sup>®</sup> Dead 488 reagent (ThermoFisher) was added to the culture medium, following the manufacturer's instructions. For immunofluorescence, cell preparations were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, then blocked and permeabilized, by incubation in 2% albumin (Roche) supplemented with 0.1% Triton X100 (Sigma-Aldrich) for 1 h. Fixed cells were incubated with the primary antibodies against: COL15A1 (HPA017913, 1/30, Sigma-Aldrich),  $\alpha$ -SMA (1A4, 1/100, Dako), or pan-cytokeratin (sc-8018, 1/10, Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C. Primary antibody was revealed by Alexa Fluor 488 or 568-conjugated antibodies (1/200, Life Technologies) and DAPI was used for nuclear staining. For dual  $\alpha$ -SMA and pan-cytokeratin immunofluorescence, Alexa Fluor 488-conjugated  $\alpha$ -SMA (1/100, Abcam) and Alexa Fluor 647-conjugated pan-CK (1/10, Cell Signaling) antibodies were used. Image acquisition was performed, using a SP8 confocal microscope (Leica). For proliferation assay, fixed cells were incubated

with the Alexa Fluor 488-conjugated Ki67 antibody (1/50, Cell Signaling) overnight at +4°C and DAPI was used for nuclear staining. Ki67-positive cells was counted in 5 random fields at magnification x20 using ImageJ software and reported to the total cell numbers (%).

### Collagen Assay

Conditioned medium prepared from cells incubated with or without 10% FBS for the last 24 h, was analyzed for soluble collagen using the Sircol collagen assay, according to the manufacturer (Sigma-Aldrich). Briefly, Sircol reagent was added to the conditioned medium to form collagen-dye complex.



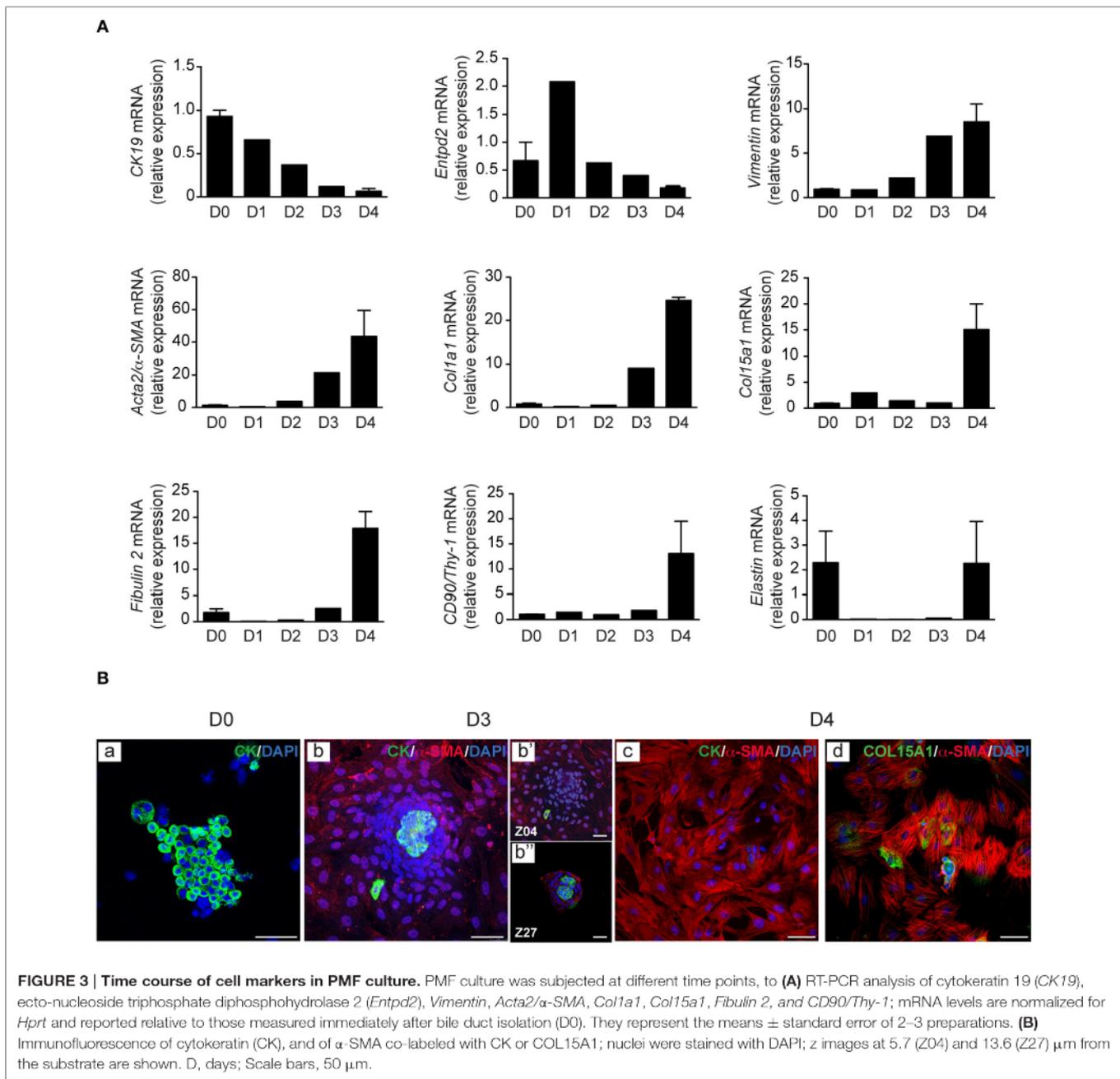
**FIGURE 2 | PMF outgrowth in culture.** PMF culture in complete medium (i.e., supplemented with 10% FBS), containing NucGreen<sup>®</sup> Dead reagent to monitor cell death, was observed by **Video-Microscopy** (Supplementary Video). Phase-contrast, fluorescent and merge images at different time points are shown. H, hours; Scale bars, 50  $\mu$ m.

The precipitates were collected by centrifugation, dissolved in 0.5 mol/L NaOH and dye concentration was estimated by spectrophotometry at 540 nm.

### PMF Culture Characterization

In the culture model of PMFs presented here, myofibroblasts are obtained by outgrowth from bile duct preparations. These preparations form small cell clusters that are entirely free of HSC contamination, as ascertained by the absence of vitamin A autofluorescence (Figure 1C). They initially contain a majority of bile duct epithelial cells as shown by cytokeratin staining (Figure 3Ba), and trace amounts of vascular structures as shown

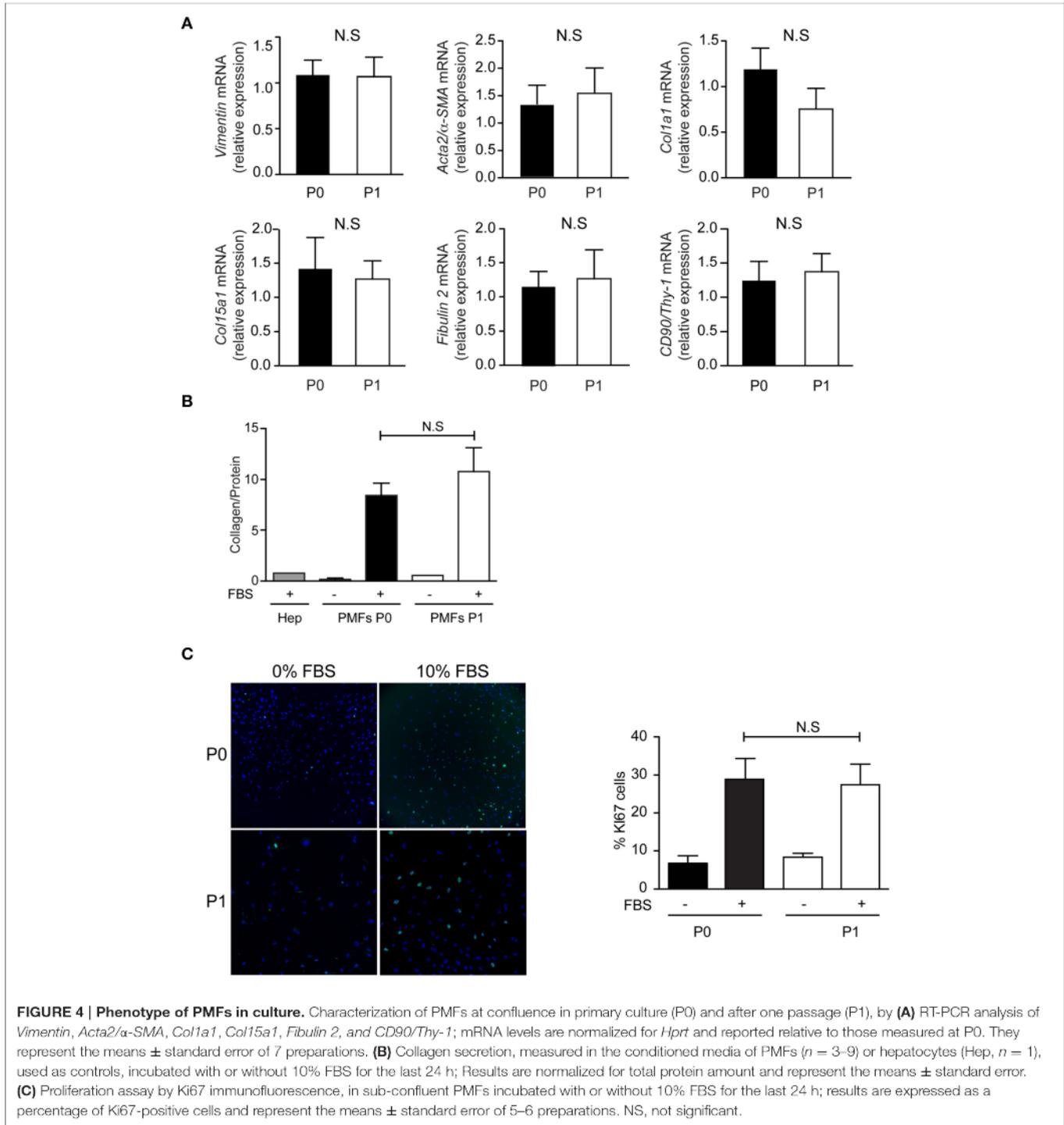
by  $\alpha$ -SMA staining detectable in approximately one bile duct segment out of five (data not shown). They are placed in culture conditions with FBS, which contains factors such as TGF- $\beta$ , that provide a growth advantage to mesenchymal cells over epithelial cells, in primary culture. In these conditions, bile duct epithelial cells die and detach from the substrate, while cells with a spindle-shape morphology, outgrow from the cell clusters. The time course of this evolution in culture can be observed by **Video-Microscopy** (Supplementary Video). Morphology of the cells observed under video-microscopy at different time points of culture, is shown in Figure 2. The time course of gene expression assessed by RT-PCR in the cultured cells (Figure 3A),



**FIGURE 3 | Time course of cell markers in PMF culture.** PMF culture was subjected at different time points, to (A) RT-PCR analysis of cytokeratin 19 (*CK19*), ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (*Entpd2*), *Vimentin*, *Acta2*/ $\alpha$ -SMA, *Col1a1*, *Col15a1*, *Fibulin 2*, and *CD90/Thy-1*; mRNA levels are normalized for *Hprt* and reported relative to those measured immediately after bile duct isolation (D0). They represent the means  $\pm$  standard error of 2–3 preparations. (B) Immunofluorescence of cytokeratin (CK), and of  $\alpha$ -SMA co-labeled with CK or COL15A1; nuclei were stained with DAPI; z images at 5.7 (Z04) and 13.6 (Z27)  $\mu$ m from the substrate are shown. D, days; Scale bars, 50  $\mu$ m.

shows that the expression of cytokeratin 19 (*CK19*) used as a marker of bile duct epithelial cells, progressively decreases over time, to become virtually absent at the stage of confluence, after 4 days in culture. The expression of *Entpd2*, previously shown to be a marker of portal fibroblasts and to undergo down-regulation during the myofibroblastic differentiation of these cells (Dranoff et al., 2002; Li et al., 2007; Wen et al., 2012), increases at day 1, when the fibroblastic cells emerge

and decline thereafter. The expressions of *Vimentin*, a general marker of mesenchymal cells, and of *Acta2/α-SMA*, a marker of myofibroblasts, progressively increase after day 2. The expression of collagen, type I, alpha 1 (*Col1a1*) increases after day 3, whereas expressions of the PMF markers *Col15a1*, *Fibulin 2*, and *CD90/Thy-1*, are induced at the stage of confluence, after 4 days. We also found that the expression of elastin, a marker of portal fibroblasts, could be detected in bile duct isolates



**FIGURE 4 | Phenotype of PMFs in culture.** Characterization of PMFs at confluence in primary culture (P0) and after one passage (P1), by **(A)** RT-PCR analysis of *Vimentin*, *Acta2/α-SMA*, *Col1a1*, *Col15a1*, *Fibulin 2*, and *CD90/Thy-1*; mRNA levels are normalized for *Hprt* and reported relative to those measured at P0. They represent the means ± standard error of 7 preparations. **(B)** Collagen secretion, measured in the conditioned media of PMFs ( $n = 3-9$ ) or hepatocytes (Hep,  $n = 1$ ), used as controls, incubated with or without 10% FBS for the last 24 h; Results are normalized for total protein amount and represent the means ± standard error. **(C)** Proliferation assay by Ki67 immunofluorescence, in sub-confluent PMFs incubated with or without 10% FBS for the last 24 h; results are expressed as a percentage of Ki67-positive cells and represent the means ± standard error of 5-6 preparations. NS, not significant.

and in confluent PMFs, but not during the period of cell expansion in culture. In two independent studies of Collagen- $\alpha 1(I)$ -green fluorescent protein (*Col1a1<sup>GFP</sup>*) mice with induced liver fibrosis, Fibulin 2, Thy-1 and elastin were overexpressed in cells considered as activated portal fibroblasts (Iwaisako et al., 2014; Lua et al., 2016). Consistent with RT-PCR analyses, dual immunolabeling shows that after 3 days, most of the cells are cytokeratin-negative (**Figure 3Bb**). Only a small number of cytokeratin-positive cells localized in the apex of the cell clusters are observed under confocal microscopy, whereas  $\alpha$ -SMA is expressed in cells that adhere to the substrate (**Figure 3Bbb'b'**). Occasionally, a cytokeratin-positive cell adhering and migrating on the substrate, can be seen at the periphery of the cluster. However, we never detected co-expression of  $\alpha$ -SMA and cytokeratin in the same cell, providing evidence against epithelial-mesenchymal transition in the emergence of PMF, although this mechanism could not be formally excluded. After 4 days, virtually all the cells are  $\alpha$ -SMA-positive, whereas cytokeratin immunofluorescence is undetectable (**Figure 3Bc**). Co-expression of  $\alpha$ -SMA and COL15A1 can be detected, although the intensity of COL15A1 immunofluorescence varies between individual cells (**Figure 3Bd**).

The comparison of confluent PMFs after 4–5 days, in primary culture (P0) and after one passage (P1), shows similar characteristics. The mRNA levels of *Vimentin*, *Acta2/ $\alpha$ -SMA*, *Col1a1*, *Col15a1*, *Fibulin 2*, and *CD90/Thy-1*, are not significantly different between PMFs at P0 and P1 (**Figure 4A**). The mRNA levels of *Elastin* and *Entpd2* are not significantly different between P0 and P1 either (Data not shown), but too low to qualify them as PMF markers. Compared to serum-free conditions or primary rat hepatocytes, PMFs grown to confluence secrete collagen abundantly, without significant difference between P0 and P1 (**Figure 4B**). PMFs are also highly proliferative in the presence of serum, without significant difference between P0 and P1 (**Figure 4C**).

*In conclusion*, the protocol that we herein describe, provides a straightforward and reproducible method to obtain PMFs in culture. There is strong evidence to indicate that the progenitor cells giving rise to PMFs *in vivo*, are present in the initial bile duct isolates. These cells proliferate intensely, they acquire a fully differentiated myofibroblastic phenotype

in primary culture and maintain this phenotype after one passage.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

HE: acquisition, analysis and interpretation of data, drafting and revision of the manuscript; EL: acquisition, analysis and interpretation of data, drafting and revision of the manuscript; SL: acquisition, analysis and interpretation of data, revision of the manuscript; AC: design and supervision of the work, acquisition, analysis and interpretation of data, drafting and revision of the manuscript; CH: conception and design of the work, interpretation of data, writing.

## FUNDING

EL received grant from the Fonds Cholangite Sclérosante Primitive.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Romain Morichon (UMS 30, LUMIC) for microscopy analyses, Tatiana Ledent, Colette Rey and the PHEA for an essential contribution to animal experiments, Lauriane Petit for RT-PCR analyses, Yves Chrétien and Roland Delelo for figure design. Funding by Fonds CSP and the French national program “Investissements d’Avenir” with the reference ANR-10-IAHU-05 (Institute of Cardiometabolism And Nutrition – ICAN) is gratefully acknowledged.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2016.00120>

**Video-Microscopy | PMF outgrowth in culture.** Bile duct isolates were plated in complete DMEM on u-Slide 2 Well Ph+ ibiTreat (Clinisciences), and placed at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. A time-lapse video was acquired using phase contrast and 488 nm channels with a camera associated to an Olympus IX83 microscope at x20 magnification. This movie stands for a 76-h experiment (assembly of images of the same PMF culture, acquired from H0 to H36 and from H52 to H76).

## REFERENCES

- Beaussier, M., Wendum, D., Schiffer, E., Dumont, S., Rey, C., Lienhart, A., et al. (2007). Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. *Lab. Invest.* 87, 292–303. doi: 10.1038/labinvest.3700513
- Bosselut, N., Housset, C., Marcelo, P., Rey, C., Burmester, T., Vinh, J., et al. (2010). Distinct proteomic features of two fibrogenic liver cell populations: hepatic stellate cells and portal myofibroblasts. *Proteomics* 10, 1017–1028. doi: 10.1002/pmic.200900257
- Cassiman, D., Libbrecht, L., Desmet, V., Denef, C., and Roskams, T. (2002). Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J. Hepatol.* 36, 200–209. doi: 10.1016/S0168-8278(01)00260-4
- Dranoff, J. A., Kruglov, E. A., Robson, S. C., Braun, N., Zimmermann, H., and Sévigny, J. (2002). The ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase

- NTPDase2/CD39L1 is expressed in a novel functional compartment within the liver. *Hepatology* 36, 1135–1144. doi: 10.1053/jhep.2002.36823
- Dudas, J., Mansuroglu, T., Batusic, D., and Ramadori, G. (2009). Thy-1 is expressed in myofibroblasts but not found in hepatic stellate cells following liver injury. *Histochem. Cell Biol.* 131, 115–127. doi: 10.1007/s00418-008-0503-y
- Friedman, S. L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* 88, 125–172. doi: 10.1152/physrev.00013.2007
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Prunotto, M., Desmouliere, A., Varga, J., et al. (2012). Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am. J. Pathol.* 180, 1340–1355. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.02.004
- Iwaisako, K., Jiang, C., Zhang, M., Cong, M., Moore-Morris, T. J., Park, T. J., et al. (2014). Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E3297–E3305. doi: 10.1073/pnas.1400062111

- Kinnman, N., Francoz, C., Barbu, V., Wendum, D., Rey, C., Hultcrantz, R., et al. (2003). The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Lab. Invest.* 83, 163–173. doi: 10.1097/01.LAB.0000054178.01162.E4
- Knittel, T., Kobold, D., Saile, B., Grundmann, A., Neubauer, K., Piscaglia, F., et al. (1999). Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 117, 1205–1221. doi: 10.1016/S0016-5085(99)70407-5
- Kruglov, E. A., Jain, D., and Dranoff, J. A. (2002). Isolation of primary rat liver fibroblasts. *J. Investig. Med.* 50, 179–184. doi: 10.2310/6650.2002.33431
- Lemoine, S., Cadoret, A., El Mourabit, H., Thabut, D., and Housset, C. (2013). Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 948–954. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.02.019
- Lemoine, S., Cadoret, A., Rautou, P. E., El Mourabit, H., Ratziu, V., Corpechot, C., et al. (2015). Portal myofibroblasts promote vascular remodeling underlying cirrhosis formation through the release of microparticles. *Hepatology* 61, 1041–1055. doi: 10.1002/hep.27318
- Li, Z., Dranoff, J. A., Chan, E. P., Uemura, M., Sévigny, J., and Wells, R. G. (2007). Transforming growth factor-beta and substrate stiffness regulate portal fibroblast activation in culture. *Hepatology* 46, 1246–1256. doi: 10.1002/hep.21792
- Lua, I., Li, Y., Zagory, J. A., Wang, K. S., French, S. W., Sévigny, J., et al. (2016). Characterization of hepatic stellate cells, portal fibroblasts, and mesothelial cells in normal and fibrotic livers. *J. Hepatol.* doi: 10.1016/j.jhep.2016.01.010. [Epub ahead of print].
- Mederacke, I., Hsu, C. C., Troeger, J. S., Huebener, P., Mu, X., Dapito, D. H., et al. (2013). Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat. Commun.* 4, 2823. doi: 10.1038/ncomms3823
- Ogawa, T., Tateno, C., Asahina, K., Fujii, H., Kawada, N., Obara, M., et al. (2007). Identification of vitamin A-free cells in a stellate cell-enriched fraction of normal rat liver as myofibroblasts. *Histochem. Cell Biol.* 127, 161–174. doi: 10.1007/s00418-006-0237-7
- Tuchweber, B., Desmoulière, A., Bochaton-Piallat, M. L., Rubbia-Brandt, L., and Gabbiani, G. (1996). Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab. Invest.* 74, 265–278.
- Uchio, K., Tuchweber, B., Manabe, N., Gabbiani, G., Rosenbaum, J., and Desmoulière, A. (2002). Cellular retinol-binding protein-1 expression and modulation during *in vivo* and *in vitro* myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells and portal fibroblasts. *Lab. Invest.* 82, 619–628. doi: 10.1038/labinvest.3780456
- Wen, J. W., Olsen, A. L., Perepelyuk, M., and Wells, R. G. (2012). Isolation of rat portal fibroblasts by *in situ* liver perfusion. *J. Vis. Exp.* 3669. doi: 10.3791/3669

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 El Mourabit, Loeuillard, Lemoine, Cadoret and Housset. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

### C) Discussion

Cet article décrit une méthode fiable et reproductible optimisée et améliorée depuis 2003 pour étudier les MFPs *in vitro*. La mise en culture de fragments de canaux biliaires a l'avantage de préserver l'environnement cellulaire du précurseur des MFPs et permet ainsi de se rapprocher au plus près du contexte d'activation myofibroblastique *in vivo*. Ces travaux décrivent au cours des différents temps de culture de manière détaillée l'expression des marqueurs des MFPs décrits dans la littérature et l'évolution de ces cellules en particulier leur prolifération.

Le précurseur des MFPs n'a pas été clairement identifié. Même si des études suggèrent que des fibroblastes portaux sont capables de se différencier en myofibroblastes(56, 57), il est peu probable que tous les MFPs dérivent de ces fibroblastes. L'identification de marqueurs spécifiques, tels que COL15A1 que nous avons récemment identifié comme le plus discriminant des MFPs et de leur progéniteur, devrait nous permettre d'isoler ce précurseur afin de le caractériser.

## II) Etude du stress du réticulum endoplasmique dans les MFPs

### A) Introduction

Le stress du RE est largement impliqué dans les maladies chroniques du foie, comme l'indiquent les études sur tissus humains et dans des modèles animaux. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle un stress du RE peut survenir dans les MFPs au cours de la fibrose. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle de MFPs activés *in vivo*, isolés à partir de foie de rats ayant subi une ligature de la voie biliaire principale (rats BDL). Après avoir caractérisé le phénotype de ces cellules, nous avons analysé l'expression de marqueurs de stress du RE. Nous avons ensuite étudié l'impact du stress du RE sur la différenciation myofibroblastique et les différentes fonctions de ces cellules. Les résultats obtenus dans cette étude sont présentés ci-dessous.

### B) Matériel et méthodes

#### 1) *Modèles cellulaires*

Les MFPs sont obtenus à partir de rats mâles Sprague Dawley sains selon le protocole précédemment décrit (Loeuillard *et al.* ; 2016).

Les MFPs activés *in vivo* sont obtenus à partir de rats mâles Sprague Dawley ayant subi une ligature/section de la voie biliaire principale 14 jours auparavant et sont comparés aux MFPs obtenus à partir de rats Sham ayant subi une laparotomie seule.

Le stress du RE est induit avec 1 $\mu$ M de tunicamycine (TM) pendant 24h préalablement diluée dans du DMSO. Dans les MFPs BDL, le stress du RE est inhibé avec 1 $\mu$ M de l'inhibiteur PERK GSK2656157. Pour les expériences d'inhibition de la synthèse protéique, les cellules ont été traitées pendant 18h avec 1 $\mu$ M de cycloheximide.

#### 2) *RT-qPCR*

L'ARN total a été soumis à une transcription inverse avec des hexamères aléatoires et 200 U de Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) pendant 1 heure à 37°C. La PCR quantitative en temps réel a été réalisée en utilisant le Sybr Green Master Mix et

le Lightcycler 96 (Roche®). Le niveau relatif d'ARNm des gènes cibles (**amorces listées tableau 2**), normalisé par rapport au gène de ménage HPRT, est exprimé de façon relative selon la méthode du  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Gènes	Genbank n°	Amorce sens	Amorce anti-sens
<i>Acta2</i>	NM_0310004.2	5'GGGACGACATGGAAAAGATCTG3'	5'CGTTGGCCTTAGGGTTCAGC3'
<i>Coll1a1</i>	NM_053304.1	5'TGAGCCAGCAGATTGAGAACA3'	5'GGGTCGATCCAGTACTCTCCG3'
<i>Vegf</i>	AY702972.1	5'TGT TTGACTGCTGTGGACTT3'	5'GACTTCGGCCTCTCTAAGAA3'
<i>Chop</i>	NM_001109986.1	5'AAGGTTTTTGATTCTTCCTCTTCGTT3'	5'GCAGGAGGTCCTGTCTCAGAT3'
<i>Gadd34</i>	AH011730.2	5'CCTTGATGTGGAAGCCCAAAGTT3'	5'TCCACTTTCTTGCTCTCTAAGGCCAT3'
<i>Trb3</i>	NM_144755.2	5'CCCGGCTGGGGCCCTATATCC3'	5'CGCTGGCGGGATACACCTTGC3'
<i>Hprt</i>	AH005530.2	5'AGGACCTCTCGAAGTGT3'	5'ATCCCTGAAGTGCTCATTATA3'

**Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées en PCR**

### 3) Western-blot

Les protéines (30  $\mu$ g) sont séparées par SDS-PAGE et transférées sur membrane de nitrocellulose. La membrane est incubée avec les anticorps dirigés contre les protéines  $\alpha$ -SMA (1/2000; Dako), Caspase-3, PARP (1/1000; Cell Signaling) ou  $\alpha$ -Tubulin (1/2000; Sigma-Aldrich), toute la nuit à 4°C, puis avec l'anticorps secondaire conjugué à l'HRP (1/10000; Cell Signaling) ou avec les anticorps secondaires de l'Odyssey (LI-COR®), pendant 1 heure à température ambiante. Le signal est révélé par chimioluminescence (ECL prime, GE Healthcare) ou par le scanner infrarouge LI-COR-Odyssey (LI-COR®). L'intensité du signal a été quantifiée à l'aide du logiciel Image Studio®.

### 4) Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay.

Les dosages ELISA du VEGF (R&D Systems) et du collagène 1 (Cloud-clone) ont été réalisés à partir du milieu conditionné des MFPs (surnageant de 24h de culture) en se référant aux instructions du fournisseur.

### 5) *Prolifération cellulaire*

La prolifération des MFPS Sham et BDL a été analysée par immunofluorescence du Ki67. Après fixation avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 15 min, les cellules sont incubées avec un anticorps anti-Ki67 conjugué à l'Alexa Fluor 488 (1/50, Cell Signaling) toute la nuit à 4°C. Le DAPI a été utilisé pour le marquage nucléaire. Les cellules Ki67 positives ont été comptées dans 5 champs aléatoires au grossissement x20 en utilisant le logiciel ImageJ et reporté au nombre total de cellules (%).

Pour l'analyse de la prolifération par incorporation d'EdU, nous avons utilisé le kit Click-it® EdU Microplate Assay (ThermoFisher scientifique) en se référant aux instructions du fournisseur.

La prolifération a également été étudiée à l'aide du système xCELLigence RTCA (ROCHE) qui permet de suivre les changements dynamiques de la prolifération cellulaire par mesure de l'impédance électrique. Pour cela, les cellules sontensemencées dans des E-plate 96 (ROCHE) dont le fond de chaque puits est recouvert de micro-électrodes d'or. L'impédance mesurée dépend de la surface recouverte par les cellules et est exprimée en cell index.

### 6) *Migration cellulaire*

La technique du Wound-healing a été réalisée avec les culture-inserts 2 puits Ibidi. A confluence, les inserts sont retirés afin de créer la brèche et la migration est enregistrée pendant 24h par video-microscopie. Ces expériences sont réalisées en présence de 2µg de mitomycine C afin d'inhiber la prolifération. La surface recouverte entre les deux fronts de migration est mesurée avec le logiciel ImageJ.

La migration a également été étudiée avec le système xCELLigence RTCA (ROCHE). Les cellules sontensemencées dans des CIM-plate et les changements d'impédance dépendent du nombre de cellules migrant à travers la membrane située entre la chambre supérieure et la chambre inférieure (principe de la chambre de Boyden). Les données sont analysées après 8h de migration.

### 7) *Matrigel-plug*

Les implants de Matrigel sont obtenus en mélangeant 400µl de growth factor-reduced Matrigel (VWR) avec 5 IU d'héparine et 100µl de milieu conditionné issus des MFPs. Ils sont ensuite injectés en sous-cutané chez des souris C57BL/6J sauvage (Janvier Labs). Tous les animaux reçoivent une injection de Matrigel-plug dans chaque flanc. 7 jours après l'injection, les implants sont retirés pour une analyse macroscopique et un dosage d'hémoglobine est effectué à l'aide de la solution de Drabkin (Sigma-Aldrich).

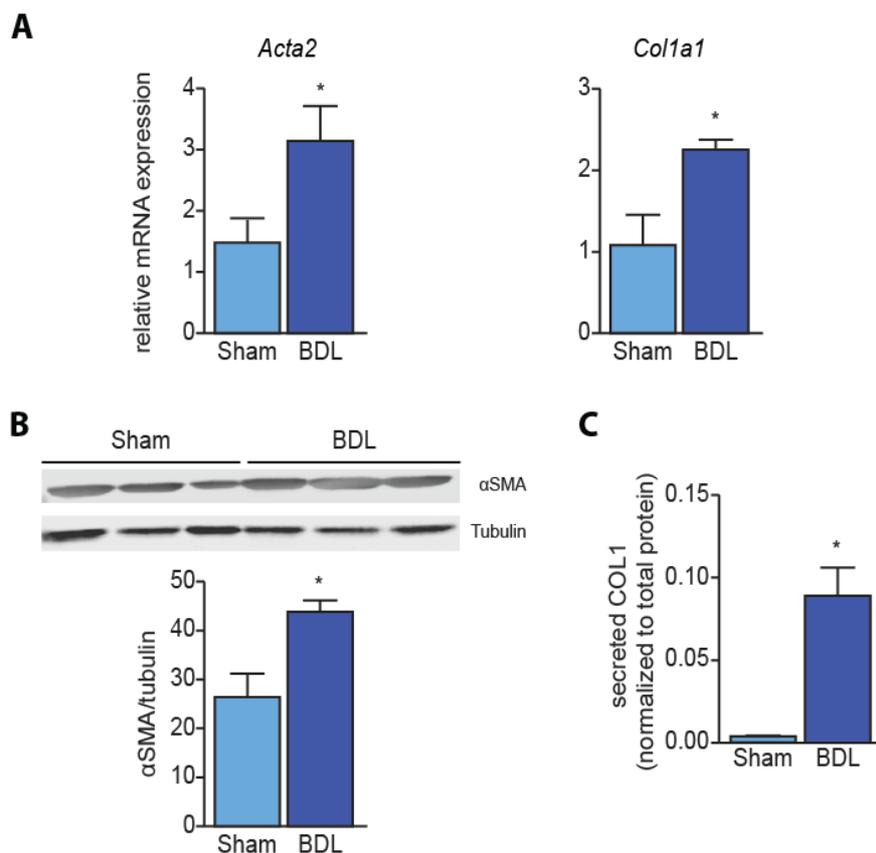
### 8) *Analyse statistique*

Le logiciel GraphPad Prism a été utilisé pour réaliser l'analyse statistique. Les comparaisons ont été effectuées à l'aide des tests de Student ou par ANOVA une voie. Les valeurs *P* inférieures ou égales à 0,05 sont considérées comme significatives. Toutes les données sont exprimées par la moyenne ± SEM.

## C) Résultats

### 1) Caractéristiques phénotypiques des MFPs activés *in vivo*

Pour connaître les caractéristiques phénotypiques des MFPs activés *in vivo* nous avons comparé les MFPs issus des rats BDL et issus de rats sham. L'analyse de l'expression de *Acta2* et *Col1a1* par RT-qPCR montre que ces deux marqueurs de myofibroblastes sont surexprimés dans les MFP BDL par rapport aux MFPs sham (**figure 9 A**). Cette surexpression se traduit par une augmentation d'expression de la protéine  $\alpha$ SMA (**figure 9 B**) et d'une augmentation de la sécrétion de collagène 1 (**figure 9 C**). Les MFPs issus de rats BDL, dont le niveau de différenciation myofibroblastique est supérieur à celui des MFPs issus des rats sham, ont donc été utilisés comme modèle de MFPs activés *in vivo*.

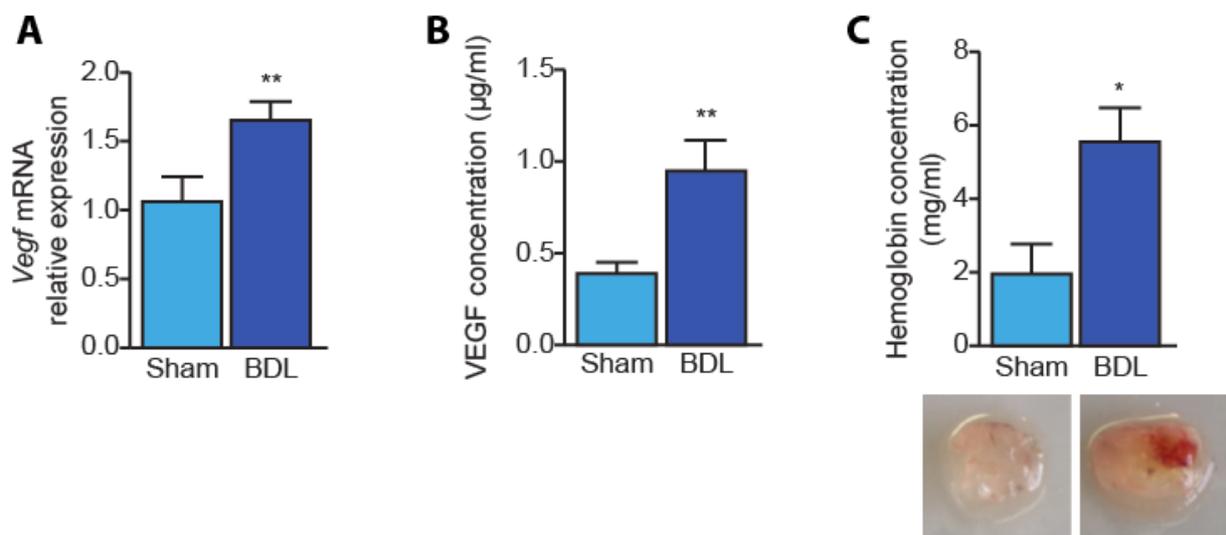


**Figure 9 : Expression des marqueurs myofibroblastiques des MFPs activés *in vivo***

Les MFPs obtenus à partir des rats sham ou des rats BDL J14 ont été comparés pour (A) l'expression par RT-qPCR des ARNm *Acta2* et *Col1a1* ( $n=9-13$ ), (B) l'abondance de protéine  $\alpha$ SMA par Western-blot ( $n=5$ ) et (C) la sécrétion de collagène quantifiée par dosage ELISA du surnageant ( $n=3-5$ ). \* $P<0,05$ .

Nous avons également étudié la capacité angiogénique, proliférative et migatoire des MFPs activés *in vivo*.

L'expression de l'ARNm *Vegf* (**figure 10 A**) et la sécrétion du VEGFA (**figure 10 B**) sont augmentées dans les MFPs BDL. Nous avons réalisé des expériences de Matrigel-plug afin de tester le pouvoir angiogénique de ces cellules *in vivo*. L'analyse macroscopique montre une vascularisation plus importante dans les implants contenant le milieu conditionné des MFPs BDL par rapport aux implants préparés avec le milieu conditionné des MFPs Sham (**figure 10 C**). Ces résultats sont confirmés par une concentration en hémoglobine plus importante dans les implants issus des MFPs BDL (**figure 10 C**).



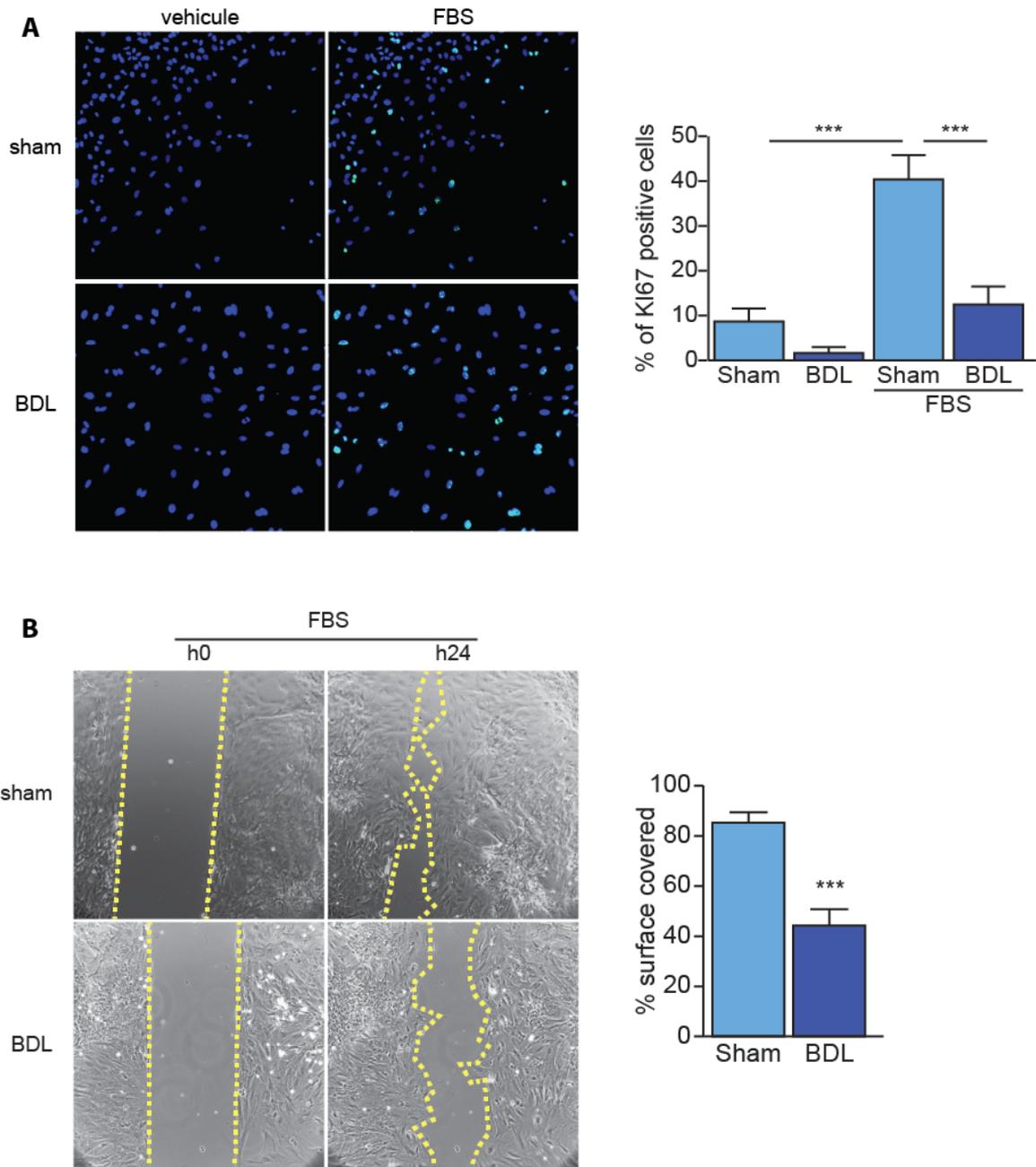
**Figure 10 : Capacité angiogénique des MFPs activés *in vivo***

Les propriétés des MFPs sham et des MFPs BDL J14 ont été analysées par (A) mesure de l'expression de l'ARNm *Vegf* par RT-qPCR ( $n=13-18$ ), (B) étude de la sécrétion du VEGFA par ELISA dans le milieu conditionné ( $n=8-9$ ) et (C) de la concentration en hémoglobine dans les matrigel-plug ( $n=5-11$ ). Les explants de matrigel-plugs sont également montrés. \*  $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ .

La prolifération a été étudiée par détection du nombre de cellules Ki67-positives (**figure 11 A**). On observe que la prolifération induite par le SVF est moins importante dans les MFPs BDL que dans les MFPs Sham.

L'analyse de la migration par wound healing met en évidence une diminution de la capacité migatoire des MFPs activés *in vivo*. En effet, la surface recouverte par les cellules après 24h de cicatrisation est 2 fois plus faible avec les MFPs BDL qu'avec les MFPs Sham (**figure 11 B**).

L'ensemble de ces résultats montre que les MFPs activés *in vivo* ont un fort potentiel pro-angiogénique alors que leurs fonctions de prolifération et de migration sont diminuées.



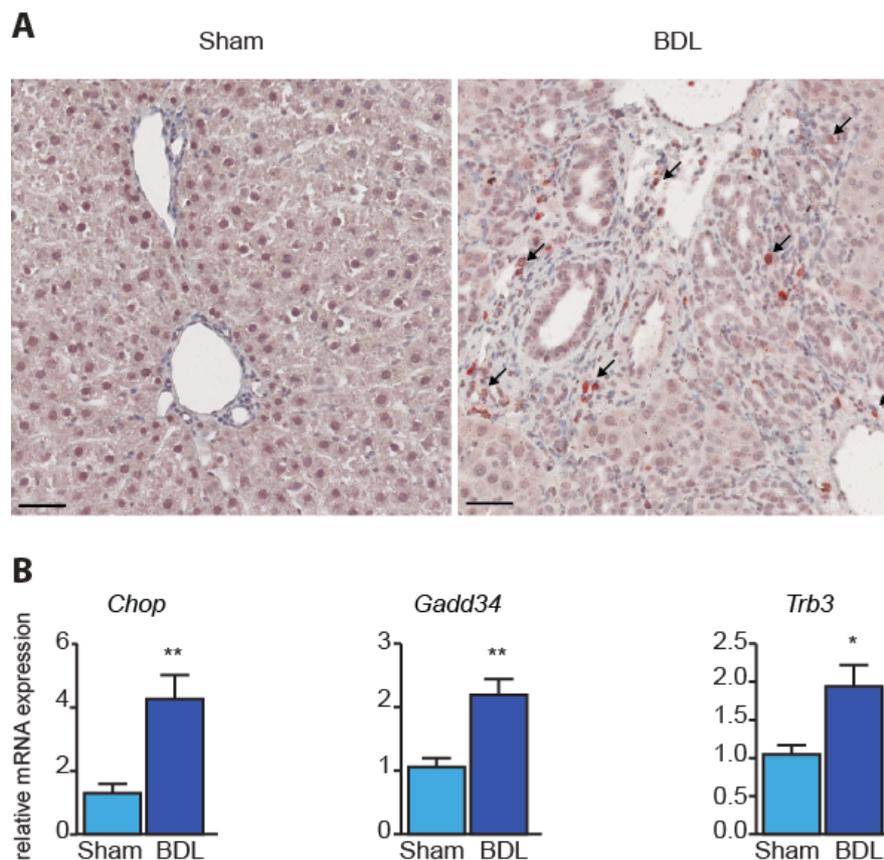
**Figure 11 : analyse de la prolifération et de la migration des MFPs activés *in vivo***

La prolifération des MFPs sham et des MFPs BDL J14 induite par le SVF est mesurée par marquage immunofluorescent de la protéine Ki67 (A). Le nombre des cellules Ki67-positives (vert) est rapporté au nombre total de cellules (bleu) ( $n= 8-18$ ). La migration des MFPs sham et des MFPs BDL est déterminée par un test de wound-healing (B). Les images en contraste de phase représentatives des résultats au temps 0h et 24h après la création de la brèche sont montrées. Le pourcentage de l'aire recouverte par les cellules est quantifié ( $n=7-10$ ). \*\*\* $P<0,001$ .

## 2) Existence d'un stress du RE dans les MFPs activés *in vivo*

Afin de déterminer s'il existe un stress du RE dans les myofibroblastes au cours de la fibrose, nous avons tout d'abord effectué un immuno-marquage de la protéine CHOP sur des coupes de foie de rats après 14 jours de BDL. Alors qu'aucun marquage de la protéine CHOP n'a été détecté sur les coupes de foie de rats sham, les coupes de foie de rats BDL montrent un marquage de la protéine CHOP localisé uniquement dans les espaces portes (**figure 12 A**).

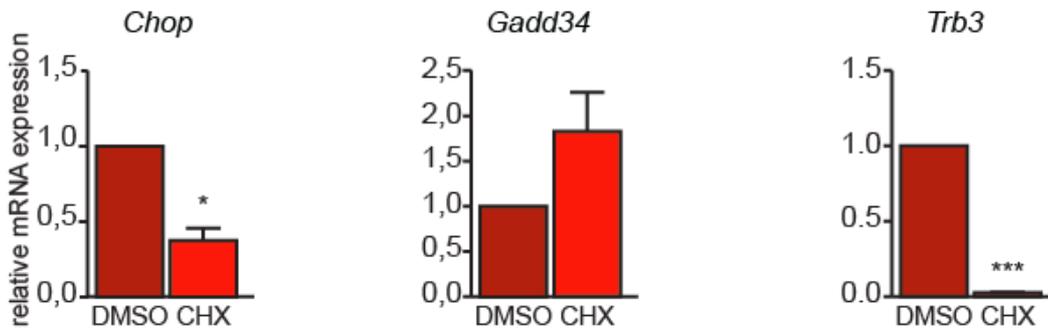
Pour confirmer la présence d'un stress du RE dans les MFPs, nous avons analysé l'expression de marqueurs du stress du RE dans les MFPs activés *in vivo*. Nos résultats montrent une augmentation de l'expression des ARNm *Chop*, *Gadd34* et *Trb3* dans les MFPs BDL (**figure 12 B**), suggérant l'activation d'un stress du RE, et plus particulièrement de la voie PERK, dans ces cellules.



**Figure 12 : Existence d'un stress du RE dans les MFPs activés *in vivo***

(A) marquage immunohistochimique de CHOP sur des coupes de foie de rat sham et de rat BDL de 14 jours. Les flèches montrent des cellules CHOP positives dans l'espace porte des foies fibreux de rat BDL, absent du foie de rat sham. Barre d'échelle 50 $\mu$ m. (B) analyse de l'expression par RT-qPCR dans les MFPs sham et les MFPs BDL des ARNm *Chop*, *Gadd34* et *Trb3* (n=8-15). \*P<0,05, \*\*P<0,01.

Afin de déterminer si le stress du RE observé dans les MFPs BDL pouvait être dû à leur forte activité de synthèse protéique, nous avons inhibé cette synthèse protéique avec la cycloheximide (CHX). On observe que ce traitement diminue fortement l'expression de *Chop* et *Trb3* et qu'il augmente l'expression de *GADD34* (**figure 13**).



**Figure 13 : Effet de l'inhibition de la synthèse protéique sur le stress du RE dans les MFPs activés *in vivo***

Analyse de l'expression par RT-qPCR des ARNm *Chop*, *Gadd34* et *Trb3* dans les MFPs BDL traités ou non à la cycloheximide, (n=3). \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

### 3) Effet de l'induction du stress du RE sur les fonctions des MFPs

Afin de déterminer les effets du stress du RE sur les MFPs, nous avons utilisé une première approche au cours de laquelle le stress du RE est induit *in vitro* dans les MFPs par un inducteur chimique, la tunicamycine. Cet inducteur chimique bloque la N-glycosylation des protéines et empêche leur maturation, provoquant ainsi un stress du RE. Comme attendu la tunicamycine induit un stress du RE dans les MFPs, mis en évidence par une forte augmentation de l'expression des ARNm *Chop*, *Gadd34* et *Trb3* (**figure 14 A**).

Le traitement par la tunicamycine des MFPs n'a pas d'effet sur l'expression des ARNm *Acta2* ou de *Colla1* (**figure 14 B**) ni sur la sécrétion de COL1 (**figure 14 C**).

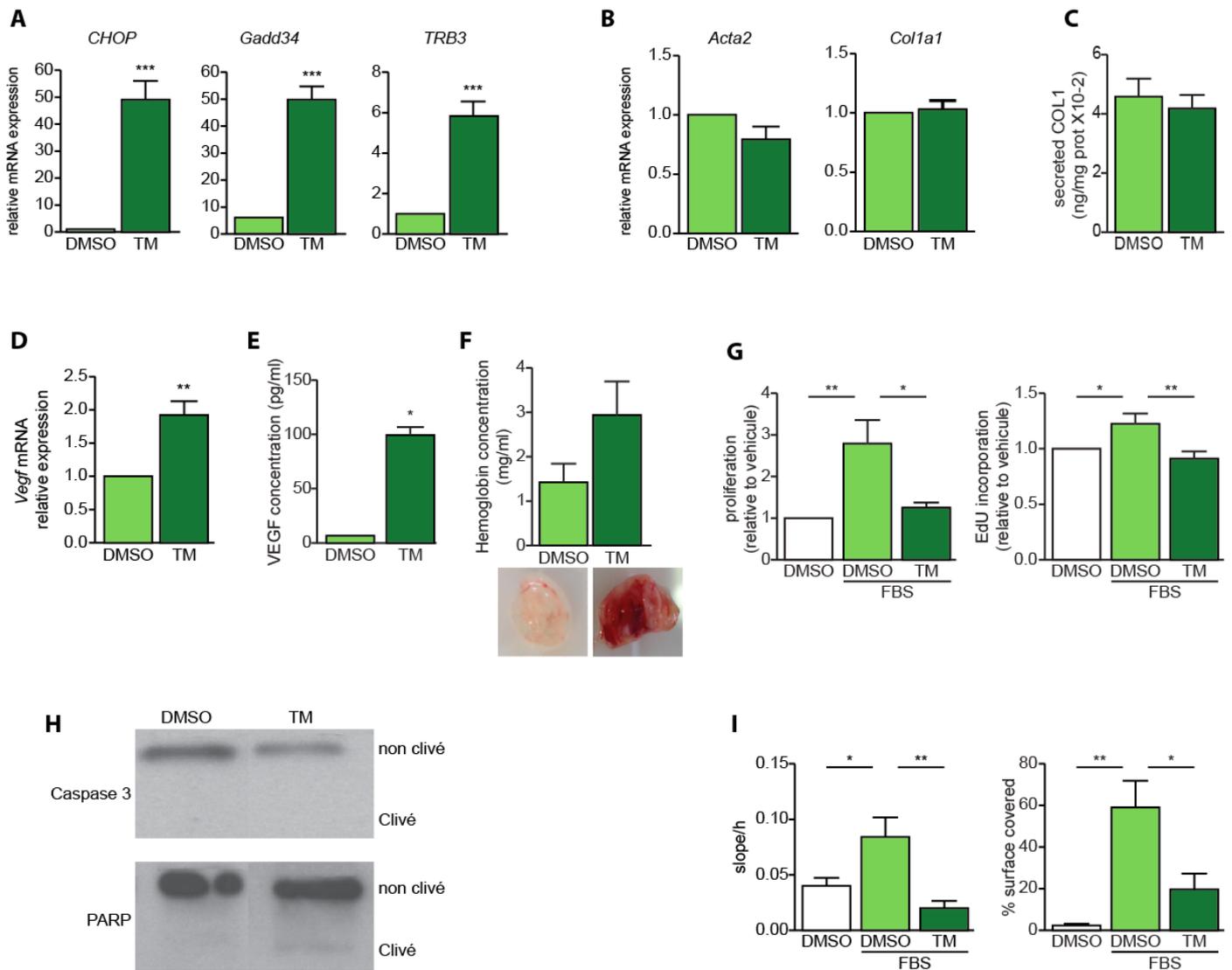
En revanche, la tunicamycine induit une augmentation de l'expression de l'ARNm *Vegf* (**figure 14 D**) et de la sécrétion de VEGFA (**figure 14 E**), qui est associée à une augmentation de la vascularisation des matrigel-plugs préparés avec le milieu conditionné des MFPs traités par la tunicamycine (**figure 14 F**).

Le traitement par la tunicamycine entraîne une inhibition de la prolifération des MFPs, comme indiqué par les expériences réalisées avec le système xCELLigence ou l'incorporation d'EdU (**figure 14 G**). Cette inhibition de la prolifération n'est pas associée à une induction de

l'apoptose, par la tunicamycine qui n'induit pas d'activation de la caspase 3 ni de PARP (**figure 14 H**).

Les analyses de migration montrent une diminution des capacités migratoires des MFPs traités par la tunicamycine (**figure 14 I**).

L'ensemble de ces résultats montre que le stress du RE induit *in vitro* par la tunicamycine stimule l'angiogenèse des MFPs et diminue la prolifération et la migration de ces cellules.



**Figure 14 : Effet du stress du RE induit par la TM sur les MFPs**

Les MFPs traités avec du DMSO utilisé comme véhicule ou la TM sont comparés pour (A) l'expression des ARNm *Chop*, *Gadd34* et *Trb3*, (B) l'expression des ARNm *Acta2* et *Col1a1* par RT-qPCR ( $n=11-16$ ) et (C) la sécrétion de COL1 ( $n=4$ ). Les propriétés angiogéniques des MFPs traités avec du DMSO ou la TM ont été étudiées par (D) mesure de l'expression du *Vegf* ( $n=10-13$ ), (E) sécrétion du VEGFA dans le surnageant de culture ( $n=4-5$ ) et (F) par test matrigel-plugs ( $n=4$ ). La prolifération induite par le SVF dans les MFPs traités avec du DMSO ou la TM a été analysée par (G) mesure de l'impédance électrique avec le système xCELLigence (panel de gauche,  $n=9$ ) et par incorporation d'EdU (panel de droite,  $n=8$ ). Les données sont exprimées en valeur relative, par rapport aux MFPs traités avec DMSO sans SVF. (H) L'expression des protéines Caspase 3 et PARP a été analysée par western-blot. (I) La migration des MFPs traités avec du DMSO ou la TM a été analysée avec le système xCELLigence (panel de gauche,  $n=12$ ) et par wound healing (panel de droite,  $n=5$ ). \* $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$ .

#### 4) Effet de l'inhibition du stress du RE dans les MFPs activés *in vivo*

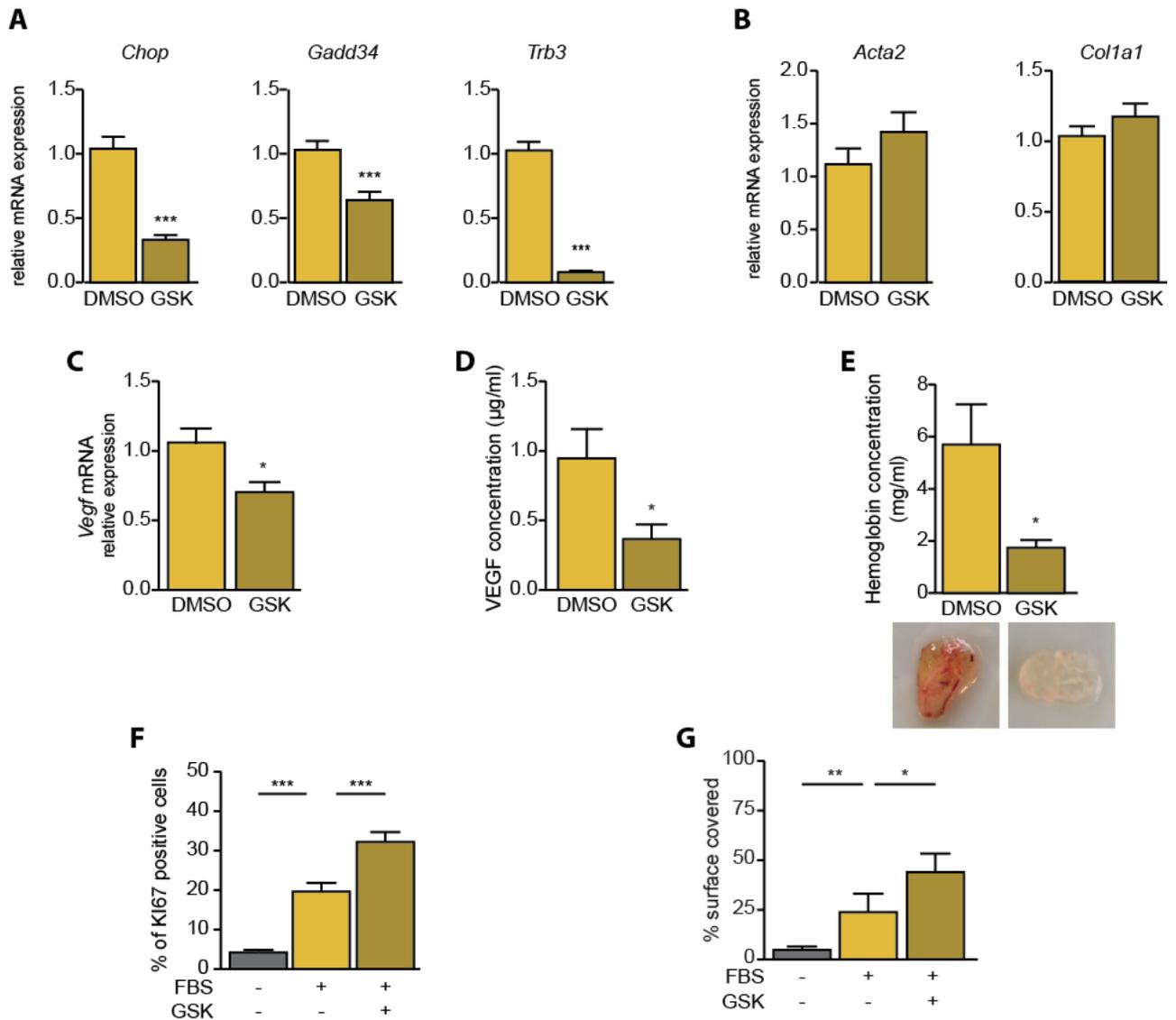
Afin de confirmer les résultats observés lors de l'induction du stress du RE par la tunicamycine, nous avons réalisé une inhibition du stress du RE dans les MFPs activés *in vivo* à l'aide d'un inhibiteur spécifique de PERK, le GSK2656157. Comme attendu, le traitement par le GSK2656157 induit une diminution de l'expression des ARNm *Chop*, *Gadd34* et *Trb3* dans les MFPs BDL (**figure 15 A**).

L'expression des marqueurs myofibroblastiques *Acta2* et *Colla1* n'est pas modifiée par l'inhibition du stress du RE dans les MFPs BDL traités par le GSK (**figure 15 B**).

L'expression et la sécrétion du VEGF sont diminuées lorsque l'on inhibe le stress du RE dans les MFPs BDL (**figure 15 C et D**). On observe également une diminution de la vascularisation des implants de Matrigel (**figure 15 E**).

De plus, le traitement des MFPs BDL par le GSK restaure partiellement la prolifération et la migration des cellules (**figure 15 F et G**).

Dans leur ensemble, nos résultats montrent que le stress du RE qui accompagne l'activation *in vivo* des MFPs, n'a pas d'effet sur la différenciation myofibroblastique des MFPs mais qu'il stimule le potentiel pro-angiogénique de ces cellules et qu'il inhibe leur prolifération et leur migration.



**Figure 15 : Effet de l'inhibition du stress du RE sur les MFPs activés *in vivo***

Les MFPs BDL sont traités avec du DMSO ou avec l'inhibiteur de PERK GSK2656157 (GSK) et comparés entre eux pour (A) l'expression des ARNm Chop, Gadd34 et Trb3 et (B) pour l'expression des ARNm Acta2 et Col1a1 par RT-qPCR (n=12-13). L'effet du traitement par le GSK a été analysé sur les propriétés angiogéniques de MFPs BDL par mesure (C) de l'expression de l'ARNm Vegf (n=13), (D) de la sécrétion du VEGFA (n=9) et par (E) test de Matrigel-plugs (n=5), (F) sur la prolifération induite par le SVF mesurée par marquage de la protéine Ki67 (n=12) et (G) sur la migration par analyse wound healing (n=7-14). \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001.

## D) Discussion

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle du stress du RE dans les myofibroblastes portaux. Nous montrons que l'activation *in vivo* des MFPs est associée à un stress du RE et que le stress du RE stimule le pouvoir pro-angiogénique des MFPs et régule de façon négative la prolifération et la migration de ces cellules.

L'analyse *in situ* de CHOP dans le foie des rats BDL montre la présence de cellules CHOP positives dans les espaces porte. Même si des expériences de co-marquage avec  $\alpha$ SMA sont nécessaires pour affirmer que ces cellules sont des myofibroblastes, l'induction des marqueurs *Chop*, *Gadd34* et *Trb3* dans les MFP isolés des rats BDL indique qu'un stress du RE existe bien dans ces cellules au cours de la fibrose. Une précédente étude a montré l'existence d'un stress du RE dans les CEF isolées de souris intoxiquées par l'alcool (110). Plus récemment, Koo et *al.* ont mis en évidence un marquage p-PERK des cellules  $\alpha$ SMA positives dans le foie de souris CCl<sub>4</sub> (106). Bien que les myofibroblastes soient principalement issus des CEFs dans ce modèle, on ne peut exclure la présence de MFPs parmi ces cellules p-PERK-positives,  $\alpha$ SMA-positives. Les MFPs activés *in vivo* montrent une activation spécifique de la voie PERK, 14 jours après BDL. Cependant, il n'est pas exclu que d'autres voies de l'UPR s'activent dans les MFPs à d'autres stades de fibrose. En effet, il a été montré une cinétique d'activation différente des voies IRE1 $\alpha$  et PERK, la voie IRE1 $\alpha$  étant activée de manière précoce avant d'être inactivée alors que la voie PERK est induite plus tardivement et maintenue au cours du stress du RE (82).

La très forte activité de synthèse et de sécrétion protéique des MFPs au cours de la fibrose pourrait être à l'origine du stress du RE dans ces cellules. Cette hypothèse est confirmée par nos expériences en présence de cycloheximide. En effet, l'inhibition globale de la synthèse protéique dans les MFP activés *in vivo* entraîne une diminution des marqueurs de stress du RE. L'analyse de la morphologie et du volume du RE pourrait appuyer cette hypothèse. D'autres facteurs sont susceptibles d'induire un stress du RE dans les MFP. Dans les hépatocytes, l'activation du stress du RE au cours de la fibrose a été imputée à des modifications du microenvironnement, notamment l'inflammation ou l'hypoxie. Des résultats préliminaires suggèrent que ces deux processus pourraient aussi participer à l'induction du stress du RE dans les MFPs. En effet, le LPS et l'hypoxie stimulent l'expression des marqueurs de stress du RE dans les MFPs *in vitro* (résultats non montrés).

Dans cette étude, nous n'avons pas mis en évidence de relation entre le stress du RE et la différenciation myofibroblastique. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans les CEFs par d'autres équipes. Ainsi, Hernandez-Gea et *al.* ont montré que l'activation des CEFs serait dépendante du stress du RE *via* un mécanisme impliquant la voie IRE1 $\alpha$  de l'UPR et l'activation de l'autophagie (110). Mais si la voie IRE1 $\alpha$  est activée précocement, on ne peut exclure que ces mécanismes s'appliquent aux MFPs dont nous n'avons pas étudié l'activation précoce dans ce travail. Une autre étude montre que la différenciation myofibroblastique de CEFs serait due à la levée d'inhibition de la voie Smad2 (106). Néanmoins, un effet délétère du stress du RE dans les CEFs myofibroblastiques a également été rapporté. En effet, les CEFs myofibroblastiques expriment le récepteur cannabinoïde qui lorsqu'il est activé par son ligand induit un stress du RE conduisant à l'apoptose des CEFs myofibroblastiques (157). De même, l'induction d'un stress du RE par la tunicamycine entraîne l'apoptose des CEFs (158, 159). Enfin, une étude suggère que le stress du RE pourrait être impliqué dans l'apoptose des CEFs au cours du processus de résolution de la fibrose obtenue après dérivation de la bile dans le modèle BDL (159). Contrairement à ces études, nos résultats montrent que, dans les MFPs, le stress du RE n'induit pas l'apoptose, malgré l'induction de CHOP.

Nos résultats montrent que le stress du RE régule de façon négative la prolifération et la migration des MFPs. L'inhibition de la prolifération est indépendante d'une induction de la sénescence dans ces cellules (résultats non montrés) et ses mécanismes restent à déterminer. Néanmoins, elle pourrait s'expliquer par l'augmentation d'expression de Trb3 dans les MFPs activés *in vivo*, cette protéine ayant été décrite comme un régulateur négatif d'Akt. Il a ainsi été récemment montré que la diminution d'expression de Trb3 dans des cellules était associée à une hyperphosphorylation d'Akt et à une augmentation de la prolifération de ces cellules (160). De plus, d'autres études montrent également une implication spécifique de PERK dans l'arrêt du cycle cellulaire induit par l'UPR notamment par l'inhibition de l'accumulation de la cycline D1 entraînant un arrêt du cycle cellulaire (89). Néanmoins, la plupart des études établissant un lien entre le stress du RE et la prolifération et la migration cellulaire ont été effectuées dans un contexte tumoral et décrivent un effet positif du stress du RE, et notamment de la voie PERK, sur la prolifération et la migration des cellules (92, 161, 162).

L'expression et la sécrétion du VEGF sont augmentées dans les MFPs subissant un stress du RE (MFPs BDL, MFP traités à la tunicamycine). Cela est en accord avec les données

de la littérature qui montrent que les différentes voies de l'UPR stimulent l'expression du VEGF (118, 125, 163).

En résumé nos résultats montrent que la voie PERK de l'UPR, induite dans les MFPs activés *in vivo*, régule négativement la prolifération et la migration des MFPs, alors qu'elle stimule les capacités angiogéniques de ces cellules. Les autres voies de l'UPR ne semblent pas impliquées puisque nous n'avons pas mis en évidence de modification des différentes protéines des voies ATF6 et IRE1. Par ailleurs, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de PERK *in vitro* restaure partiellement la prolifération et la migration des MFPs et diminue leur pouvoir angiogénique. Néanmoins, des expériences en présence d'inhibiteurs spécifiques des 2 autres voies de l'UPR permettraient d'écarter complètement la contribution de ces voies au phénotype observé dans les MFPs activés *in vivo*.

Le stress du RE semble d'une manière générale avoir un rôle pro-fibrosant durant les pathologies chroniques. En induisant l'apoptose des cellules épithéliales, il favorise la progression de la fibrose. Cet effet délétère du stress du RE dans les cellules épithéliales a été observé dans différents organes comme les poumons, le rein, l'intestin ou encore le foie (78, 164-166). Le fait que le stress du RE soit impliqué dans l'activation des CEFs est également en faveur d'un rôle pro-fibrosant. Nos résultats montrent que le stress du RE inhibe la prolifération et la migration des MFPs, suggérant un contrôle négatif de la progression de la fibrose. En revanche, le stress du RE stimule les capacités pro-angiogéniques de nos cellules. Même si l'angiogenèse est plutôt décrite comme favorisant la fibrose certaines études montrent que l'inhibition de l'angiogenèse favorise la fibrose (18). L'impact de l'activation du stress du RE dans les MFPs sur la progression de la fibrose reste donc à déterminer *in vivo*. Pour cela, nous envisageons d'administrer l'inhibiteur de PERK aux rats BDL

### **III) Effet de l'UDCA sur les MFPs activés *in vivo***

#### **A) Introduction**

L'UDCA est un acide biliaire hydrophile représentant 4% du total des acides biliaires chez un individu normal (127). L'UDCA est prescrit en clinique dans le cas de maladies hépatiques, notamment cholestatiques. Au niveau des hépatocytes, l'UDCA est conjugué à la taurine pour former le TUDCA ou à la glycine pour former le GUDCA, puis est exporté dans les voies biliaires. L'administration d'UDCA permet principalement par l'intermédiaire de ces conjugués, de réduire la toxicité du pool d'acides biliaires en augmentant le caractère hydrophile de ce dernier. L'UDCA est ainsi capable de ralentir la progression de la fibrose sans pour autant l'inhiber de façon très efficace. Il a été montré également que les conjugués de l'UDCA pouvait réguler certains processus cellulaires comme l'apoptose induite par le stress du RE, ou dans le cas du TUDCA directement moduler le stress du RE en agissant comme une protéine chaperonne (138). Les effets de l'UDCA ont particulièrement été étudiés dans les hépatocytes et les cholangiocytes dans lesquels l'UDCA diminue la mort cellulaire. Cependant l'UDCA est efficace uniquement pendant les stades précoces de la maladie et n'est pas capable de bloquer le développement de la fibrose. Or les principaux acteurs de la fibrose sont les myofibroblastes. Ces cellules sont responsables de la synthèse de la MEC et l'effet de l'UDCA sur ces cellules est peu étudié. L'UDCA est principalement administré lors de maladies biliaires, au cours desquelles les MFPs ont un rôle prépondérant. Ayant démontré que les MFPs subissaient un stress du RE dans un modèle de fibrose biliaire, nous nous sommes demandés si le TUDCA pourrait moduler le stress du RE et donc les fonctions des MFPs dans un sens qui expliquerait la faible efficacité de l'UDCA sur la fibrose. Pour cela nous avons étudié l'effet du TUDCA sur la différenciation myofibroblastique, le stress du RE et les fonctions des MFPs.

## B) Matériel et méthodes

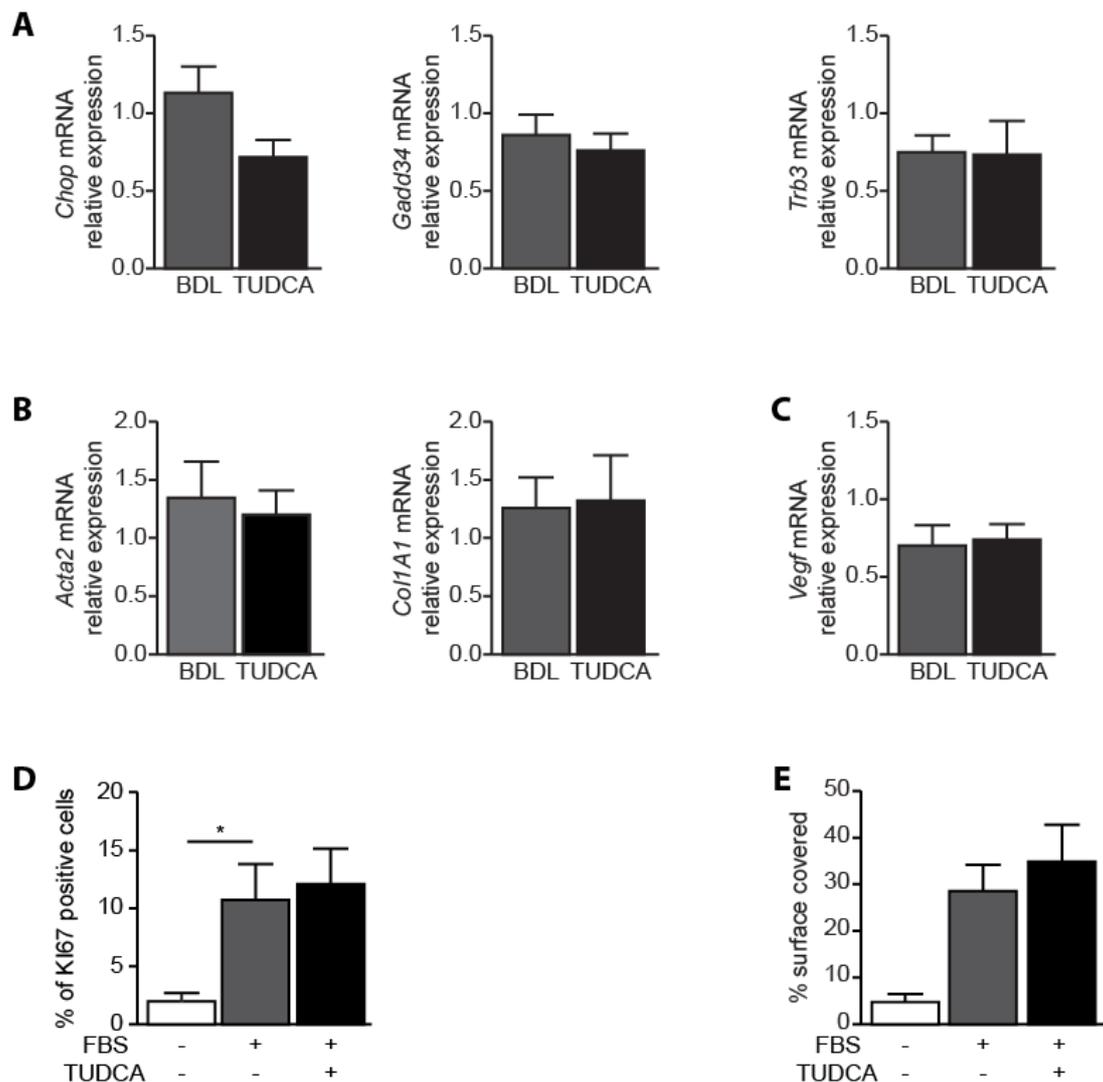
Les MFPs sont isolés comme décrit ci-dessus à partir de rats BDL J14. Les cellules sont ensuite placées 24h dans un milieu sans sérum, avant d'être traitées ou non avec 1mM de TUDCA en milieu supplémenté.

## C) Résultats

### 1) *Inhibition du stress du RE par le TUDCA dans les MFPs activés in vivo*

Afin de se rapprocher de la clinique, nous avons étudié les effets du TUDCA sur les MFPs activés *in vivo*. En nous rapportant aux différentes études publiées nous avons choisi d'utiliser le TUDCA à la concentration de 1mM pour réaliser notre analyse. Le TUDCA est décrit comme ayant une action directe sur le stress du RE contrairement à l'UDCA qui agirait plutôt sur l'apoptose induite par le stress du RE (143). Afin de déterminer l'action du TUDCA sur le stress du RE dans les MFPs activés *in vivo*, nous avons étudié l'expression des ARNm *Chop*, *Gadd34* et *Trb3*. L'expression de l'ARNm *Chop* semble diminuer dans les MFPs activés *in vivo* traité au TUDCA mais cette diminution n'est pas significative ( $p=0,539$ ). L'expression des autres marqueurs du stress du RE, *Gadd34* et *Trb3* n'est pas modifiée par le TUDCA (**figure 16 A**). Dans ces conditions, le traitement par le TUDCA n'a pas d'effet sur le stress du RE dans les MFPs activés *in vivo*.

Le TUDCA ne modifie pas non plus l'expression des ARNm *Acta2* et *Coll1a1* dans les MFPs BDL (**figure 16 B**). Il n'a donc pas d'effet sur la différenciation myofibroblastique des MFPs activés *in vivo*. Le TUDCA n'a pas non plus d'effet sur l'expression du VEGF dans les MFPs activés *in vivo* (**figure 16 C**). Les expériences de marquage du Ki67 et de wound healing montrent que le TUDCA ne modifie ni la prolifération ni la migration des MFPs BDL (**figure 16 D, E**). L'ensemble de ces résultats montre que le TUDCA n'inhibe pas la voie PERK de l'UPR dans les MFPs activés *in vivo* et qu'il n'a pas d'effet sur les fonctions et la différenciation myofibroblastique de ces cellules.



**Figure 16 : Effet du TUDCA sur les MFPs activés *in vivo***

Le TUDCA est administré à 1mM et son effet sur les MFPs activés *in vivo* est analysé pour (A) l'expression des ARNm Chop, Gadd34 et Trb3, (B) l'expression des ARNm Acta2 et Col1a1 et (C) l'expression de l'ARNm Vegf par RT-qPCR (n=14-13). L'effet du TUDCA a été analysé, (D) sur la prolifération induite par le SVF mesurée par marquage de la protéine Ki67 (n=7) et (E) sur la migration par wound healing (n=5). Toutes les valeurs sont rapportées par la moyenne  $\pm$  SEM; \*P<0.05.

## D) Discussion

Les études antérieures sur l'effet anti-fibrotique de l'UDCA se focalisent uniquement sur la capacité anti-apoptotique de cette molécule dans les cellules épithéliales. Or les myofibroblastes représentent les principaux acteurs de la fibrose et le stress du RE une composante importante de leur activation (106). Ces résultats montrent que le TUDCA n'a pas d'effet sur les fonctions ou la différenciation myofibroblastique des MFPs.

L'UDCA et ses conjugués sont souvent décrits comme des molécules chaperonnes capables d'inhiber le stress du RE (143) et sont administrés en clinique principalement lors de maladies cholestatiques. Dans ces maladies chroniques du foie la fibrose est associée à un stress du RE (101, 167, 168) conduisant à l'apoptose des cellules épithéliales (85) et à l'activation des CEFs (106, 110). Quelques études ont montré une inhibition du stress du RE par le TUDCA dans les cellules épithéliales (169-171). Nous avons montré que le TUDCA avait peu ou pas d'effet sur des marqueurs du stress du RE, la différenciation myofibroblastique et sur les principales fonctions des MFPs. Cependant, cela peut s'expliquer par l'absence de transporteur d'acides biliaires. En effet, il a été montré dans la littérature que les CEFs exprimaient seulement que très faiblement le transporteur OATP3 (153) permettant l'entrée de très faible quantité d'acides biliaires dans ces cellules. Nous avons analysé l'expression des principaux transporteurs d'acides biliaires dans les MFPs par RT-qPCR (données personnelles non montrées). Ces résultats préliminaires montrent que ces transporteurs ne sont pas exprimés dans les MFPs. L'entrée du TUDCA dans la cellule étant nécessaire pour que celui-ci exerce son rôle de molécule chaperonne (151) pourrait expliquer l'absence d'effet du TUDCA sur les MFPs.

L'absence d'effet du TUDCA sur les fonctions des MFPs va à l'encontre d'un effet direct positif ou négatif sur la fibrose.

Troisième partie :

# **Conclusion**

## Conclusion et perspectives

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre au point une méthode d'isolement des MFPs, simple, fiable, et reproductible utilisée pour l'étude *in vitro* de MFPs. Ils ont également permis de montrer l'existence d'un stress du RE dans les MFPs lors de la fibrose hépatique capable de réguler d'importantes fonctions cellulaires pouvant impacter l'évolution de la pathologie. Ces résultats ont notamment complété les travaux réalisés au laboratoire sur l'implication des MFPs dans l'angiogenèse en démontrant l'importance du stress du RE dans ce mécanisme. Nous avons également démontré que le TUDCA n'avait pas d'effet sur le stress du RE ni sur les fonctions étudiées dans les MFPs isolés.

Nos résultats montrent que la voie PERK de l'UPR, induite dans les MFPs activés *in vivo*, régule négativement la prolifération et la migration de ces cellules mais stimule leurs capacités angiogéniques. L'impact de l'activation du stress du RE dans les MFPs sur la progression de la fibrose reste à déterminer *in vivo*. Nous nous proposons donc d'étudier l'effet de l'inhibiteur de PERK dans le modèle de rats BDL. Le stress du RE présent lors des maladies hépatiques chroniques est principalement décrit comme un facteur pro-fibrosant (85). Plusieurs molécules ciblant le stress du RE sont actuellement à l'étude (172). L'inhibition du stress du RE dans la fibrose hépatique pourrait être une stratégie prometteuse et l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques représente une approche simple et rapide. Néanmoins, l'administration d'un inhibiteur de PERK *in vivo* entraînerait une inhibition de PERK dans toutes les cellules hépatiques pouvant induire un biais dans l'interprétation de l'effet sur la fibrose. L'activation de PERK plutôt décrite dans les CEFs comme un facteur d'activation myofibroblastique (106) suggère un effet bénéfique de l'inhibition de cette voie. Bien que nos résultats dans le rat BDL semblent indiquer une activation de PERK restreinte à certaines cellules de l'espace porte, on ne peut négliger un effet de l'inhibition de cette voie sur les autres cellules du foie et de l'organisme. L'inhibition de PERK dans le foie sain entraîne une perturbation de l'expression des gènes régulés par le stress cellulaire induit par les changements physiologiques ce qui conduit à l'apoptose des hépatocytes (173). De plus, l'administration d'un tel inhibiteur à long terme induit des effets secondaires considérables sur les fonctions pancréatiques, immunitaires et hépatiques (172). Par ailleurs, le facteur de transcription ATF4 est un acteur central dans le devenir de la cellule et une modulation prolongée de ce facteur entraîne une perturbation de l'homéostasie cellulaire de l'organisme. La diminution du niveau basal du facteur de transcription ATF4 entraîne dans les hépatocytes en plus d'une perturbation du métabolisme

lipidique, une diminution de la synthèse des stéroïdes, une diminution de l'adhésion cellulaire et une diminution de la synthèse et de la sécrétion des acides biliaires (174). L'UPR joue un rôle important dans plusieurs fonctions clés du foie comme le métabolisme lipidique et les mécanismes de détoxification. L'utilisation d'inhibiteur de l'UPR dans l'étude de la fibrose hépatique nécessite donc une analyse minutieuse de l'effet hépatotoxique. De plus, l'inhibition pharmacologique de PERK présente quelques limites. Bien que l'inhibiteur de PERK GSK265657 présente une grande spécificité on ne peut exclure des interactions non spécifiques avec d'autres voies. D'autres approches peuvent être envisagées comme l'utilisation de siRNA ou d'un dominant négatif de PERK. Ces deux techniques présentent une plus grande spécificité que l'inhibiteur pharmacologique, mais leur utilisation reste limitée par leur faisabilité dans notre modèle expérimental. Afin de s'affranchir d'un effet délétère dû à l'inhibition de PERK *in vivo*, d'autres molécules ciblant spécifiquement GADD34 ou eIF2 $\alpha$ , en aval de la voie PERK, pourrait également être utilisées mais leur effet devrait être déterminé *in vitro* sur les MFPs BDL avant d'envisager une utilisation *in vivo*.

Malgré ces écueils, l'utilisation de l'inhibiteur de PERK dans le modèle de rats BDL devrait nous permettre de mieux comprendre le rôle du stress du RE dans les MFPs dans la fibrogenèse.

Enfin, il serait intéressant d'étudier l'effet du stress du RE sur les myofibroblastes activés dans d'autres modèles de fibrose hépatique, afin de déterminer si les régulations mises en évidence dans notre étude peuvent être généralisées à l'ensemble des maladies chroniques du foie.

## Table des figures et des tableaux

Figure 1 : Le lobule hépatique, unité fonctionnelle du foie .....	5
Figure 2 : Evolution naturelle de la fibrose hépatique .....	6
Figure 3 : Localisation des cellules étoilées du foie .....	12
Figure 4 : Contribution des MFP au remodelage vasculaire au cours de la progression de la fibrose hépatique .....	17
Figure 5 : Diminution de la charge protéique dans le RE par l'UPR .....	20
Figure 6 : Les voies de signalisation de l'UPR .....	22
Figure 7 : Modèles d'activation des voies IRE1 $\alpha$ et PERK .....	23
Figure 8 : Induction de l'apoptose par la voie PERK .....	26
Figure 9 : Expression des marqueurs myofibroblastiques des MFPs activés <i>in vivo</i> .....	54
Figure 10 : Capacité angiogénique des MFPs activés <i>in vivo</i> .....	55
Figure 11 : analyse de la prolifération et de la migration des MFPs activés <i>in vivo</i> .....	56
Figure 12 : Existence d'un stress du RE dans les MFPs activés <i>in vivo</i> .....	57
Figure 13 : Effet de l'inhibition de la synthèse protéique sur le stress du RE dans les MFPs activés <i>in vivo</i> .....	58
Figure 14 : Effet du stress du RE induit par la TM sur les MFPs .....	60
Figure 15 : Effet de l'inhibition du stress du RE sur les MFPs activés <i>in vivo</i> .....	62
Figure 16 : Effet du TUDCA sur les MFPs activés <i>in vivo</i> .....	68
Tableau 1 : Classification et description du score de fibrose METAVIR .....	6
Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées en PCR .....	51

## Bibliographie

1. Hernandez-Gea, V., and Friedman, S. L. (2011) Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual review of pathology* **6**, 425-456
2. (1994) Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* **20**, 15-20
3. 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
4. Pinzani, M. (2015) Pathophysiology of Liver Fibrosis. *Digestive diseases* **33**, 492-497
5. Drixler, T. A., Vogten, M. J., Ritchie, E. D., van Vroonhoven, T. J., Gebbink, M. F., Voest, E. E., and Borel Rinkes, I. H. (2002) Liver regeneration is an angiogenesis-associated phenomenon. *Ann Surg* **236**, 703-711; discussion 711-702
6. Fernandez, M., Semela, D., Bruix, J., Colle, I., Pinzani, M., and Bosch, J. (2009) Angiogenesis in liver disease. *Journal of hepatology* **50**, 604-620
7. Corpechot, C., Barbu, V., Wendum, D., Kinnman, N., Rey, C., Poupon, R., Housset, C., and Rosmorduc, O. (2002) Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* **35**, 1010-1021
8. Rosmorduc, O., Wendum, D., Corpechot, C., Galy, B., Sebbagh, N., Raleigh, J., Housset, C., and Poupon, R. (1999) Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *The American journal of pathology* **155**, 1065-1073
9. Zhang, Z., Zhang, F., Lu, Y., and Zheng, S. (2015) Update on implications and mechanisms of angiogenesis in liver fibrosis. *Hepatol Res* **45**, 162-178
10. Tugues, S., Fernandez-Varo, G., Munoz-Luque, J., Ros, J., Arroyo, V., Rodes, J., Friedman, S. L., Carmeliet, P., Jimenez, W., and Morales-Ruiz, M. (2007) Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* **46**, 1919-1926
11. Taura, K., De Minicis, S., Seki, E., Hatano, E., Iwaisako, K., Osterreicher, C. H., Kodama, Y., Miura, K., Ikai, I., Uemoto, S., and Brenner, D. A. (2008) Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis. *Gastroenterology* **135**, 1729-1738
12. Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Hicklin, D. J., Wu, Y., Yanase, K., Namisaki, T., Yamazaki, M., Tsujinoue, H., Imazu, H., Masaki, T., and Fukui, H. (2003) Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* **52**, 1347-1354
13. Ehling, J., Bartneck, M., Wei, X., Gremse, F., Fech, V., Mockel, D., Baeck, C., Hittatiya, K., Eulberg, D., Luedde, T., Kiessling, F., Trautwein, C., Lammers, T., and Tacke, F. (2014) CCL2-dependent infiltrating macrophages promote angiogenesis in progressive liver fibrosis. *Gut* **63**, 1960-1971
14. Moon, J. O., Welch, T. P., Gonzalez, F. J., and Copple, B. L. (2009) Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **296**, G582-592

15. Copple, B. L., Kaska, S., and Wentling, C. (2012) Hypoxia-inducible factor activation in myeloid cells contributes to the development of liver fibrosis in cholestatic mice. *J Pharmacol Exp Ther* **341**, 307-316
16. Novo, E., Cannito, S., Zamara, E., Valfre di Bonzo, L., Caligiuri, A., Cravanzola, C., Compagnone, A., Colombatto, S., Marra, F., Pinzani, M., and Parola, M. (2007) Proangiogenic cytokines as hypoxia-dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells. *The American journal of pathology* **170**, 1942-1953
17. Rosmorduc, O. (2010) Antiangiogenic therapies in portal hypertension: a breakthrough in hepatology. *Gastroenterol Clin Biol* **34**, 446-449
18. Patsenker, E., Popov, Y., Stickel, F., Schneider, V., Ledermann, M., Sagesser, H., Niedobitek, G., Goodman, S. L., and Schuppan, D. (2009) Pharmacological inhibition of integrin alphavbeta3 aggravates experimental liver fibrosis and suppresses hepatic angiogenesis. *Hepatology* **50**, 1501-1511
19. Yang, L., Kwon, J., Popov, Y., Gajdos, G. B., Ordog, T., Brekken, R. A., Mukhopadhyay, D., Schuppan, D., Bi, Y., Simonetto, D., and Shah, V. H. (2014) Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterology* **146**, 1339-1350 e1331
20. Sandbo, N., and Dulin, N. (2011) Actin cytoskeleton in myofibroblast differentiation: ultrastructure defining form and driving function. *Transl Res* **158**, 181-196
21. Darby, I. A., Laverdet, B., Bonte, F., and Desmouliere, A. (2014) Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol* **7**, 301-311
22. Guyot, C., Combe, C., and Desmouliere, A. (2006) The common bile duct ligation in rat: A relevant in vivo model to study the role of mechanical stress on cell and matrix behaviour. *Histochem Cell Biol* **126**, 517-523
23. Friedman, S. L. (2008) Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* **88**, 125-172
24. Kulasekaran, P., Scavone, C. A., Rogers, D. S., Arenberg, D. A., Thannickal, V. J., and Horowitz, J. C. (2009) Endothelin-1 and transforming growth factor-beta1 independently induce fibroblast resistance to apoptosis via AKT activation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **41**, 484-493
25. Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., and Janmey, P. A. (2005) Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil Cytoskeleton* **60**, 24-34
26. Aarabi, S., Bhatt, K. A., Shi, Y., Paterno, J., Chang, E. I., Loh, S. A., Holmes, J. W., Longaker, M. T., Yee, H., and Gurtner, G. C. (2007) Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. *FASEB J* **21**, 3250-3261
27. Grinnell, F., Ho, C. H., Lin, Y. C., and Skuta, G. (1999) Differences in the regulation of fibroblast contraction of floating versus stressed collagen matrices. *J Biol Chem* **274**, 918-923
28. Wipff, P. J., Rifkin, D. B., Meister, J. J., and Hinz, B. (2007) Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol* **179**, 1311-1323
29. 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. *Journal of hepatology* **45**, 429-438
30. Higashiyama, R., Moro, T., Nakao, S., Mikami, K., Fukumitsu, H., Ueda, Y., Ikeda, K., Adachi, E., Bou-Gharios, G., Okazaki, I., and Inagaki, Y. (2009) Negligible contribution

- of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. *Gastroenterology* **137**, 1459-1466 e1451
31. Kaimori, A., Potter, J., Kaimori, J. Y., Wang, C., Mezey, E., and Koteish, A. (2007) Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* **282**, 22089-22101
  32. Taura, K., Miura, K., Iwaisako, K., Osterreicher, C. H., Kodama, Y., Penz-Osterreicher, M., and Brenner, D. A. (2010) Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* **51**, 1027-1036
  33. Scholten, D., Osterreicher, C. H., Scholten, A., Iwaisako, K., Gu, G., Brenner, D. A., and Kisseleva, T. (2010) Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* **139**, 987-998
  34. Claperon, A., Mergey, M., Nguyen Ho-Boulidoires, T. H., Vignjevic, D., Wendum, D., Chretien, Y., Merabtene, F., Frazao, A., Paradis, V., Housset, C., Guedj, N., and Fouassier, L. (2014) EGF/EGFR axis contributes to the progression of cholangiocarcinoma through the induction of an epithelial-mesenchymal transition. *Journal of hepatology* **61**, 325-332
  35. Senoo, H., Kojima, N., and Sato, M. (2007) Vitamin A-storing cells (stellate cells). *Vitam Horm* **75**, 131-159
  36. Roskams, T. (2006) Different types of liver progenitor cells and their niches. *Journal of hepatology* **45**, 1-4
  37. Rockey, D. C., Housset, C. N., and Friedman, S. L. (1993) Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. *The Journal of clinical investigation* **92**, 1795-1804
  38. Housset, C., Rockey, D. C., and Bissell, D. M. (1993) Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 9266-9270
  39. 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. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **287**, G757-763
  40. Deleve, L. D., Wang, X., and Guo, Y. (2008) Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology* **48**, 920-930
  41. Kent, G., Gay, S., Inouye, T., Bahu, R., Minick, O. T., and Popper, H. (1976) Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**, 3719-3722
  42. Mederacke, I., Dapito, D. H., Affo, S., Uchinami, H., and Schwabe, R. F. (2015) High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nat Protoc* **10**, 305-315
  43. Bartneck, M., Warzecha, K. T., Tag, C. G., Sauer-Lehnen, S., Heymann, F., Trautwein, C., Weiskirchen, R., and Tacke, F. (2015) Isolation and time lapse microscopy of highly pure hepatic stellate cells. *Anal Cell Pathol (Amst)* **2015**, 417023
  44. Ramm, G. A. (1998) Isolation and culture of rat hepatic stellate cells. *J Gastroenterol Hepatol* **13**, 846-851
  45. Caliari, S. R., Perepelyuk, M., Cosgrove, B. D., Tsai, S. J., Lee, G. Y., Mauck, R. L., Wells, R. G., and Burdick, J. A. (2016) Stiffening hydrogels for investigating the dynamics of hepatic stellate cell mechanotransduction during myofibroblast activation. *Sci Rep* **6**, 21387

46. Cassiman, D., Libbrecht, L., Desmet, V., Deneef, C., and Roskams, T. (2002) Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *Journal of hepatology* **36**, 200-209
47. Mederacke, I., Hsu, C. C., Troeger, J. S., Huebener, P., Mu, X., Dapito, D. H., Pradere, J. P., and Schwabe, R. F. (2013) Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun* **4**, 2823
48. Beaussier, M., Wendum, D., Schiffer, E., Dumont, S., Rey, C., Lienhart, A., and Housset, C. (2007) Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **87**, 292-303
49. Kinnman, N., Francoz, C., Barbu, V., Wendum, D., Rey, C., Hultcrantz, R., Poupon, R., and Housset, C. (2003) The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **83**, 163-173
50. Degott, C., Zafrani, E. S., Callard, P., Balkau, B., Poupon, R. E., and Poupon, R. (1999) Histopathological study of primary biliary cirrhosis and the effect of ursodeoxycholic acid treatment on histology progression. *Hepatology* **29**, 1007-1012
51. Michalak, S., Rousselet, M. C., Bedossa, P., Pilette, C., Chappard, D., Oberti, F., Gallois, Y., and Cales, P. (2003) Respective roles of porto-septal fibrosis and centrilobular fibrosis in alcoholic liver disease. *J Pathol* **201**, 55-62
52. Bosselut, N., Housset, C., Marcelo, P., Rey, C., Burmester, T., Vinh, J., Vaubourdolle, M., Cadoret, A., and Baudin, B. (2010) Distinct proteomic features of two fibrogenic liver cell populations: hepatic stellate cells and portal myofibroblasts. *Proteomics* **10**, 1017-1028
53. El Mourabit, H., Loeuillard, E., Lemoine, S., Cadoret, A., and Housset, C. (2016) Culture Model of Rat Portal Myofibroblasts. *Front Physiol* **7**, 120
54. Knittel, T., Kobold, D., Saile, B., Grundmann, A., Neubauer, K., Piscaglia, F., and Ramadori, G. (1999) Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* **117**, 1205-1221
55. Li, Z., Dranoff, J. A., Chan, E. P., Uemura, M., Seigny, J., and Wells, R. G. (2007) Transforming growth factor-beta and substrate stiffness regulate portal fibroblast activation in culture. *Hepatology* **46**, 1246-1256
56. Tuchweber, B., Desmouliere, A., Bochaton-Piallat, M. L., Rubbia-Brandt, L., and Gabbiani, G. (1996) Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **74**, 265-278
57. Dranoff, J. A., Kruglov, E. A., Robson, S. C., Braun, N., Zimmermann, H., and Seigny, J. (2002) The ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase NTPDase2/CD39L1 is expressed in a novel functional compartment within the liver. *Hepatology* **36**, 1135-1144
58. Dudas, J., Mansuroglu, T., Batusic, D., Saile, B., and Ramadori, G. (2007) Thy-1 is an in vivo and in vitro marker of liver myofibroblasts. *Cell Tissue Res* **329**, 503-514
59. Ogawa, T., Tateno, C., Asahina, K., Fujii, H., Kawada, N., Obara, M., and Yoshizato, K. (2007) Identification of vitamin A-free cells in a stellate cell-enriched fraction of normal rat liver as myofibroblasts. *Histochem Cell Biol* **127**, 161-174

60. Iwaisako, K., Taura, K., Koyama, Y., Takemoto, K., and Asagiri, M. (2014) Strategies to Detect Hepatic Myofibroblasts in Liver Cirrhosis of Different Etiologies. *Current pathobiology reports* **2**, 209-215
61. Argraves, W. S., Greene, L. M., Cooley, M. A., and Gallagher, W. M. (2003) Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO Rep* **4**, 1127-1131
62. Ono, R. N., Sengle, G., Charbonneau, N. L., Carlberg, V., Bachinger, H. P., Sasaki, T., Lee-Arteaga, S., Zilberberg, L., Rifkin, D. B., Ramirez, F., Chu, M. L., and Sakai, L. Y. (2009) Latent transforming growth factor beta-binding proteins and fibulins compete for fibrillin-1 and exhibit exquisite specificities in binding sites. *J Biol Chem* **284**, 16872-16881
63. Strom, A., Olin, A. I., Aspberg, A., and Hultgardh-Nilsson, A. (2006) Fibulin-2 is present in murine vascular lesions and is important for smooth muscle cell migration. *Cardiovasc Res* **69**, 755-763
64. Karin, D., Koyama, Y., Brenner, D., and Kisseleva, T. (2016) The characteristics of activated portal fibroblasts/myofibroblasts in liver fibrosis. *Differentiation* **92**, 84-92
65. Lemoine, S., Cadoret, A., Rautou, P. E., El Mourabit, H., Ratzu, V., Corpechot, C., Rey, C., Bosselut, N., Barbu, V., Wendum, D., Feldmann, G., Boulanger, C., Henegar, C., Housset, C., and Thabut, D. (2015) Portal myofibroblasts promote vascular remodeling underlying cirrhosis formation through the release of microparticles. *Hepatology* **61**, 1041-1055
66. Kinnman, N., Goria, O., Wendum, D., Gendron, M. C., Rey, C., Poupon, R., and Housset, C. (2001) Hepatic stellate cell proliferation is an early platelet-derived growth factor-mediated cellular event in rat cholestatic liver injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **81**, 1709-1716
67. Kim, K. H., Chen, C. C., Alpini, G., and Lau, L. F. (2015) CCN1 induces hepatic ductular reaction through integrin alphavbeta(5)-mediated activation of NF-kappaB. *The Journal of clinical investigation* **125**, 1886-1900
68. He, Y., Wu, G. D., Sadahiro, T., Noh, S. I., Wang, H., Talavera, D., Wang, H., Vierling, J. M., and Klein, A. S. (2008) Interaction of CD44 and hyaluronic acid enhances biliary epithelial proliferation in cholestatic livers. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **295**, G305-312
69. Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Stein, H., and Surrenti, C. (1991) Transforming growth factors beta 1 and beta 2 are differentially expressed in fibrotic liver disease. *The American journal of pathology* **139**, 1221-1229
70. Grappone, C., Pinzani, M., Parola, M., Pellegrini, G., Caligiuri, A., DeFranco, R., Marra, F., Herbst, H., Alpini, G., and Milani, S. (1999) Expression of platelet-derived growth factor in newly formed cholangiocytes during experimental biliary fibrosis in rats. *Journal of hepatology* **31**, 100-109
71. Lua, I., Li, Y., Zagory, J. A., Wang, K. S., French, S. W., Seigny, J., and Asahina, K. (2016) Characterization of hepatic stellate cells, portal fibroblasts, and mesothelial cells in normal and fibrotic livers. *Journal of hepatology* **64**, 1137-1146
72. Lemoine, S., Thabut, D., and Housset, C. (2016) Portal myofibroblasts connect angiogenesis and fibrosis in liver. *Cell Tissue Res* **365**, 583-589
73. Hetz, C., Chevet, E., and Oakes, S. A. (2015) Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol* **17**, 829-838
74. Hetz, C. (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 89-102

75. Ron, D., and Walter, P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 519-529
76. Walter, P., and Ron, D. (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081-1086
77. Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D., and Glimcher, L. H. (2011) The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha. *Physiol Rev* **91**, 1219-1243
78. Baiceanu, A., Mesdom, P., Lagouge, M., and Foufelle, F. (2016) Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis. *Nat Rev Endocrinol* **12**, 710-722
79. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., and Ron, D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 326-332
80. Harding, H. P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271-274
81. Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H. P., and Ron, D. (2004) CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* **18**, 3066-3077
82. Walter, F., Schmid, J., Dussmann, H., Concannon, C. G., and Prehn, J. H. (2015) Imaging of single cell responses to ER stress indicates that the relative dynamics of IRE1/XBP1 and PERK/ATF4 signalling rather than a switch between signalling branches determine cell survival. *Cell death and differentiation* **22**, 1502-1516
83. Ma, Y., Brewer, J. W., Diehl, J. A., and Hendershot, L. M. (2002) Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol* **318**, 1351-1365
84. McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y., and Holbrook, N. J. (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* **21**, 1249-1259
85. Malhi, H., and Kaufman, R. J. (2011) Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *Journal of hepatology* **54**, 795-809
86. Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., and Hayashi, H. (2005) TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J* **24**, 1243-1255
87. Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y. H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C. L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M. S., Sartor, M. A., and Kaufman, R. J. (2013) ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol* **15**, 481-490
88. Lu, M., Lawrence, D. A., Marsters, S., Acosta-Alvear, D., Kimmig, P., Mendez, A. S., Paton, A. W., Paton, J. C., Walter, P., and Ashkenazi, A. (2014) Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science* **345**, 98-101
89. Brewer, J. W., Hendershot, L. M., Sherr, C. J., and Diehl, J. A. (1999) Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 8505-8510
90. Brewer, J. W., and Diehl, J. A. (2000) PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 12625-12630

91. Hamanaka, R. B., Bennett, B. S., Cullinan, S. B., and Diehl, J. A. (2005) PERK and GCN2 contribute to eIF2alpha phosphorylation and cell cycle arrest after activation of the unfolded protein response pathway. *Mol Biol Cell* **16**, 5493-5501
92. Nagelkerke, A., Bussink, J., van der Kogel, A. J., Sweep, F. C., and Span, P. N. (2013) The PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response affects radioresistance by interfering with the DNA damage response. *Radiother Oncol* **108**, 415-421
93. Senft, D., and Ronai, Z. A. (2015) UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci* **40**, 141-148
94. Teckman, J. H., and Perlmutter, D. H. (2000) Retention of mutant alpha(1)-antitrypsin Z in endoplasmic reticulum is associated with an autophagic response. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **279**, G961-974
95. Houck, S. A., Ren, H. Y., Madden, V. J., Bonner, J. N., Conlin, M. P., Janovick, J. A., Conn, P. M., and Cyr, D. M. (2014) Quality control autophagy degrades soluble ERAD-resistant conformers of the misfolded membrane protein GnRHR. *Mol Cell* **54**, 166-179
96. Tomar, D., Prajapati, P., Sripada, L., Singh, K., Singh, R., Singh, A. K., and Singh, R. (2013) TRIM13 regulates caspase-8 ubiquitination, translocation to autophagosomes and activation during ER stress induced cell death. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, 3134-3144
97. Rubiolo, J. A., Lopez-Alonso, H., Martinez, P., Millan, A., Cagide, E., Vieytes, M. R., Vega, F. V., and Botana, L. M. (2014) Yessotoxin induces ER-stress followed by autophagic cell death in glioma cells mediated by mTOR and BNIP3. *Cell Signal* **26**, 419-432
98. Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L. H., and Hotamisligil, G. S. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457-461
99. Gregor, M. F., Yang, L., Fabbrini, E., Mohammed, B. S., Eagon, J. C., Hotamisligil, G. S., and Klein, S. (2009) Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* **58**, 693-700
100. Puri, P., Mirshahi, F., Cheung, O., Natarajan, R., Maher, J. W., Kellum, J. M., and Sanyal, A. J. (2008) Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **134**, 568-576
101. Tamaki, N., Hatano, E., Taura, K., Tada, M., Kodama, Y., Nitta, T., Iwaisako, K., Seo, S., Nakajima, A., Ikai, I., and Uemoto, S. (2008) CHOP deficiency attenuates cholestasis-induced liver fibrosis by reduction of hepatocyte injury. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **294**, G498-505
102. Bernstein, H., Payne, C. M., Bernstein, C., Schneider, J., Beard, S. E., and Crowley, C. L. (1999) Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein malfolding by the bile salt, deoxycholate. *Toxicology letters* **108**, 37-46
103. Tsuchiya, S., Tsuji, M., Morio, Y., and Oguchi, K. (2006) Involvement of endoplasmic reticulum in glycochenodeoxycholic acid-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Toxicology letters* **166**, 140-149
104. Adachi, T., Kaminaga, T., Yasuda, H., Kamiya, T., and Hara, H. (2014) The involvement of endoplasmic reticulum stress in bile acid-induced hepatocellular injury. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* **54**, 129-135
105. Bochkis, I. M., Rubins, N. E., White, P., Furth, E. E., Friedman, J. R., and Kaestner, K. H. (2008) Hepatocyte-specific ablation of Foxa2 alters bile acid homeostasis and results in endoplasmic reticulum stress. *Nature medicine* **14**, 828-836

106. Koo, J. H., Lee, H. J., Kim, W., and Kim, S. G. (2016) Endoplasmic Reticulum Stress in Hepatic Stellate Cells Promotes Liver Fibrosis via PERK-Mediated Degradation of HNRNPA1 and Up-regulation of SMAD2. *Gastroenterology* **150**, 181-193 e188
107. Hetherington, A. M., Sawyez, C. G., Zilberman, E., Stoianov, A. M., Robson, D. L., and Borradaile, N. M. (2016) Differential Lipotoxic Effects of Palmitate and Oleate in Activated Human Hepatic Stellate Cells and Epithelial Hepatoma Cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **39**, 1648-1662
108. Sasaki, R., Kanda, T., Nakamura, M., Nakamoto, S., Haga, Y., Wu, S., Shirasawa, H., and Yokosuka, O. (2016) Possible Involvement of Hepatitis B Virus Infection of Hepatocytes in the Attenuation of Apoptosis in Hepatic Stellate Cells. *PLoS one* **11**, e0146314
109. Hu, J., Han, H., Lau, M. Y., Lee, H., MacVeigh-Aloni, M., and Ji, C. (2015) Effects of combined alcohol and anti-HIV drugs on cellular stress responses in primary hepatocytes and hepatic stellate and kupffer cells. *Alcohol Clin Exp Res* **39**, 11-20
110. Hernandez-Gea, V., Hilscher, M., Rozenfeld, R., Lim, M. P., Nieto, N., Werner, S., Devi, L. A., and Friedman, S. L. (2013) Endoplasmic reticulum stress induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy. *Journal of hepatology* **59**, 98-104
111. Borkham-Kamphorst, E., Steffen, B. T., Van de Leur, E., Tihaa, L., Haas, U., Voitok, M. M., Meurer, S. K., and Weiskirchen, R. (2016) Adenoviral CCN gene transfers induce in vitro and in vivo endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. *Biochimica et biophysica acta* **1863**, 2604-2612
112. Borkham-Kamphorst, E., Steffen, B. T., Van de Leur, E., Haas, U., Tihaa, L., Friedman, S. L., and Weiskirchen, R. (2016) CCN1/CYR61 overexpression in hepatic stellate cells induces ER stress-related apoptosis. *Cell Signal* **28**, 34-42
113. Matsuzaki, S., Hiratsuka, T., Taniguchi, M., Shingaki, K., Kubo, T., Kiya, K., Fujiwara, T., Kanazawa, S., Kanematsu, R., Maeda, T., Takamura, H., Yamada, K., Miyoshi, K., Hosokawa, K., Tohyama, M., and Katayama, T. (2015) Physiological ER Stress Mediates the Differentiation of Fibroblasts. *PLoS one* **10**, e0123578
114. Heindryckx, F., Binet, F., Ponticos, M., Rombouts, K., Lau, J., Kreuger, J., and Gerwins, P. (2016) Endoplasmic reticulum stress enhances fibrosis through IRE1alpha-mediated degradation of miR-150 and XBP-1 splicing. *EMBO Mol Med* **8**, 729-744
115. Maiers, J. L., Kostallari, E., Mushref, M., deAssuncao, T. M., Li, H., Jalan-Sakrikar, N., Huebert, R. C., Cao, S., Malhi, H., and Shah, V. H. (2016) The unfolded protein response mediates fibrogenesis and collagen I secretion through regulating TANGO1 in mice. *Hepatology*
116. Binet, F., and Sapienza, P. (2015) ER Stress and Angiogenesis. *Cell Metab* **22**, 560-575
117. Pereira, E. R., Frudd, K., Awad, W., and Hendershot, L. M. (2014) Endoplasmic reticulum (ER) stress and hypoxia response pathways interact to potentiate hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) transcriptional activity on targets like vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Biol Chem* **289**, 3352-3364
118. Ghosh, R., Lipson, K. L., Sargent, K. E., Mercurio, A. M., Hunt, J. S., Ron, D., and Urano, F. (2010) Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS one* **5**, e9575
119. Pereira, E. R., Liao, N., Neale, G. A., and Hendershot, L. M. (2010) Transcriptional and post-transcriptional regulation of proangiogenic factors by the unfolded protein response. *PLoS one* **5**

120. Bouvier, N., Fougeray, S., Beaune, P., Thervet, E., and Pallet, N. (2012) The unfolded protein response regulates an angiogenic response by the kidney epithelium during ischemic stress. *J Biol Chem* **287**, 14557-14568
121. Oskolkova, O. V., Afonyushkin, T., Leitner, A., von Schlieffen, E., Gargalovic, P. S., Lusic, A. J., Binder, B. R., and Bochkov, V. N. (2008) ATF4-dependent transcription is a key mechanism in VEGF up-regulation by oxidized phospholipids: critical role of oxidized sn-2 residues in activation of unfolded protein response. *Blood* **112**, 330-339
122. Roybal, C. N., Yang, S., Sun, C. W., Hurtado, D., Vander Jagt, D. L., Townes, T. M., and Abcouwer, S. F. (2004) Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J Biol Chem* **279**, 14844-14852
123. Afonyushkin, T., Oskolkova, O. V., Philippova, M., Resink, T. J., Erne, P., Binder, B. R., and Bochkov, V. N. (2010) Oxidized phospholipids regulate expression of ATF4 and VEGF in endothelial cells via NRF2-dependent mechanism: novel point of convergence between electrophilic and unfolded protein stress pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 1007-1013
124. Philippe, C., Dubrac, A., Quelen, C., Desquesnes, A., Van Den Berghe, L., Segura, C., Filleron, T., Pyronnet, S., Prats, H., Brousset, P., and Touriol, C. (2016) PERK mediates the IRES-dependent translational activation of mRNAs encoding angiogenic growth factors after ischemic stress. *Sci Signal* **9**, ra44
125. Karali, E., Bellou, S., Stellas, D., Klinakis, A., Murphy, C., and Fotsis, T. (2014) VEGF Signals through ATF6 and PERK to promote endothelial cell survival and angiogenesis in the absence of ER stress. *Mol Cell* **54**, 559-572
126. Poupon, R., Chretien, Y., Poupon, R. E., Ballet, F., Calmus, Y., and Darnis, F. (1987) Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis? *Lancet* **1**, 834-836
127. Hofmann, A. F. (1994) Pharmacology of ursodeoxycholic acid, an enterohepatic drug. *Scand J Gastroenterol Suppl* **204**, 1-15
128. Kullak-Ublick, G. A., Stieger, B., Hagenbuch, B., and Meier, P. J. (2000) Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis* **20**, 273-292
129. Van Nieuwkerk, C. M., Elferink, R. P., Groen, A. K., Ottenhoff, R., Tytgat, G. N., Dingemans, K. P., Van Den Bergh Weerman, M. A., and Offerhaus, G. J. (1996) Effects of Ursodeoxycholate and cholate feeding on liver disease in FVB mice with a disrupted *mdr2* P-glycoprotein gene. *Gastroenterology* **111**, 165-171
130. Fickert, P., Fuchsbichler, A., Wagner, M., Zollner, G., Kaser, A., Tilg, H., Krause, R., Lammert, F., Langner, C., Zatloukal, K., Marschall, H. U., Denk, H., and Trauner, M. (2004) Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in *Mdr2* (*Abcb4*) knockout mice. *Gastroenterology* **127**, 261-274
131. Sinakos, E., Marschall, H. U., Kowdley, K. V., Befeler, A., Keach, J., and Lindor, K. (2010) Bile acid changes after high-dose ursodeoxycholic acid treatment in primary sclerosing cholangitis: Relation to disease progression. *Hepatology* **52**, 197-203
132. Lindor, K. D., Kowdley, K. V., Luketic, V. A., Harrison, M. E., McCashland, T., Befeler, A. S., Harnois, D., Jorgensen, R., Petz, J., Keach, J., Mooney, J., Sargeant, C., Braaten, J., Bernard, T., King, D., Miceli, E., Schmoll, J., Hoskin, T., Thapa, P., and Enders, F. (2009) High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* **50**, 808-814

133. Benz, C., Angermuller, S., Tox, U., Kloters-Plachky, P., Riedel, H. D., Sauer, P., Stremmel, W., and Stiehl, A. (1998) Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile-acid-induced apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes. *Journal of hepatology* **28**, 99-106
134. Hofmann, A. F. (1999) Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol Sci* **14**, 24-29
135. Botla, R., Spivey, J. R., Aguilar, H., Bronk, S. F., and Gores, G. J. (1995) Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection. *J Pharmacol Exp Ther* **272**, 930-938
136. Rodrigues, C. M., Fan, G., Ma, X., Kren, B. T., and Steer, C. J. (1998) A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *The Journal of clinical investigation* **101**, 2790-2799
137. Qiao, L., Studer, E., Leach, K., McKinstry, R., Gupta, S., Decker, R., Kukreja, R., Valerie, K., Nagarkatti, P., El Deiry, W., Molkentin, J., Schmidt-Ullrich, R., Fisher, P. B., Grant, S., Hylemon, P. B., and Dent, P. (2001) Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and FAS receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/mitogen-activated protein kinase-signaling module enhances DCA-induced apoptosis. *Mol Biol Cell* **12**, 2629-2645
138. Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R. O., Gorgun, C. Z., and Hotamisligil, G. S. (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* **313**, 1137-1140
139. Zhou, Y., Doyen, R., and Lichtenberger, L. M. (2009) The role of membrane cholesterol in determining bile acid cytotoxicity and cytoprotection of ursodeoxycholic acid. *Biochimica et biophysica acta* **1788**, 507-513
140. Fickert, P., Zollner, G., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Pojer, C., Zenz, R., Lammert, F., Stieger, B., Meier, P. J., Zatloukal, K., Denk, H., and Trauner, M. (2001) Effects of ursodeoxycholic and cholic acid feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver. *Gastroenterology* **121**, 170-183
141. Zollner, G., Fickert, P., Fuchsbichler, A., Silbert, D., Wagner, M., Arbeiter, S., Gonzalez, F. J., Marschall, H. U., Zatloukal, K., Denk, H., and Trauner, M. (2003) Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. *Journal of hepatology* **39**, 480-488
142. Salvioli, G., Lugli, R., Pradelli, J. M., Frignani, A., and Boccalletti, V. (1988) Urinary excretion of bile acids during acute administration in man. *Eur J Clin Invest* **18**, 22-28
143. Roma, M. G., Toledo, F. D., Boaglio, A. C., Basiglio, C. L., Crocenzi, F. A., and Sanchez Pozzi, E. J. (2011) Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clin Sci (Lond)* **121**, 523-544
144. Pusl, T., and Beuers, U. (2006) Ursodeoxycholic acid treatment of vanishing bile duct syndromes. *World journal of gastroenterology : WJG* **12**, 3487-3495
145. Kurz, A. K., Graf, D., Schmitt, M., Vom Dahl, S., and Haussinger, D. (2001) Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology* **121**, 407-419
146. Beuers, U., Hohenester, S., de Buy Wenniger, L. J., Kremer, A. E., Jansen, P. L., and Elferink, R. P. (2010) The biliary HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies. *Hepatology* **52**, 1489-1496

147. Yoshikawa, M., Tsujii, T., Matsumura, K., Yamao, J., Matsumura, Y., Kubo, R., Fukui, H., and Ishizaka, S. (1992) Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune responses. *Hepatology* **16**, 358-364
148. Bergamini, A., Dini, L., Baiocchi, L., Cappannoli, L., Falasca, L., Bolacchi, F., Capozzi, M., Faggioli, E., Nistri, A., Salanitro, A., Ventura, L., Rocchi, G., and Angelico, M. (1997) Bile acids with differing hydrophilic-hydrophobic properties do not influence cytokine production by human monocytes and murine Kupffer cells. *Hepatology* **25**, 927-933
149. Park, G. Y., Han, Y. K., Han, J. Y., and Lee, C. G. (2016) Tauroursodeoxycholic acid reduces the invasion of MDA-MB-231 cells by modulating matrix metalloproteinases 7 and 13. *Oncol Lett* **12**, 2227-2231
150. Cao, A. L., Wang, L., Chen, X., Wang, Y. M., Guo, H. J., Chu, S., Liu, C., Zhang, X. M., and Peng, W. (2016) Ursodeoxycholic acid and 4-phenylbutyrate prevent endoplasmic reticulum stress-induced podocyte apoptosis in diabetic nephropathy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **96**, 610-622
151. Gani, A. R., Uppala, J. K., and Ramaiah, K. V. (2015) Tauroursodeoxycholic acid prevents stress induced aggregation of proteins in vitro and promotes PERK activation in HepG2 cells. *Archives of biochemistry and biophysics* **568**, 8-15
152. Namisaki, T., Noguchi, R., Moriya, K., Kitade, M., Aihara, Y., Douhara, A., Nishimura, N., Takeda, K., Okura, Y., Kawaratani, H., Takaya, H., Seki, K., and Yoshiji, H. (2016) Beneficial effects of combined ursodeoxycholic acid and angiotensin-II type 1 receptor blocker on hepatic fibrogenesis in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of gastroenterology* **51**, 162-172
153. Svegliati-Baroni, G., Ridolfi, F., Hannivoort, R., Saccomanno, S., Homan, M., De Minicis, S., Jansen, P. L., Candelaresi, C., Benedetti, A., and Moshage, H. (2005) Bile acids induce hepatic stellate cell proliferation via activation of the epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology* **128**, 1042-1055
154. Rao, Y. P., Studer, E. J., Stravitz, R. T., Gupta, S., Qiao, L., Dent, P., and Hylemon, P. B. (2002) Activation of the Raf-1/MEK/ERK cascade by bile acids occurs via the epidermal growth factor receptor in primary rat hepatocytes. *Hepatology* **35**, 307-314
155. Werneburg, N. W., Yoon, J. H., Higuchi, H., and Gores, G. J. (2003) Bile acids activate EGF receptor via a TGF- $\alpha$ -dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **285**, G31-36
156. Reinehr, R., Graf, D., and Haussinger, D. (2003) Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology* **125**, 839-853
157. 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 & disease* **2**, e170
158. Huang, Y., Li, X., Wang, Y., Wang, H., Huang, C., and Li, J. (2014) Endoplasmic reticulum stress-induced hepatic stellate cell apoptosis through calcium-mediated JNK/P38 MAPK and Calpain/Caspase-12 pathways. *Mol Cell Biochem* **394**, 1-12
159. De Minicis, S., Candelaresi, C., Agostinelli, L., Taffetani, S., Saccomanno, S., Rychlicki, C., Trozzi, L., Marzioni, M., Benedetti, A., and Svegliati-Baroni, G. (2012) Endoplasmic Reticulum stress induces hepatic stellate cell apoptosis and contributes to fibrosis resolution. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **32**, 1574-1584

160. Szabat, M., Page, M. M., Panzhinskiy, E., Skovso, S., Mojibian, M., Fernandez-Tajes, J., Bruin, J. E., Bround, M. J., Lee, J. T., Xu, E. E., Taghizadeh, F., O'Dwyer, S., van de Bunt, M., Moon, K. M., Sinha, S., Han, J., Fan, Y., Lynn, F. C., Trucco, M., Borchers, C. H., Foster, L. J., Nislow, C., Kieffer, T. J., and Johnson, J. D. (2016) Reduced Insulin Production Relieves Endoplasmic Reticulum Stress and Induces beta Cell Proliferation. *Cell Metab* **23**, 179-193
161. Mujcic, H., Nagelkerke, A., Rouschop, K. M., Chung, S., Chaudary, N., Span, P. N., Clarke, B., Milosevic, M., Sykes, J., Hill, R. P., Koritzinsky, M., and Wouters, B. G. (2013) Hypoxic activation of the PERK/eIF2alpha arm of the unfolded protein response promotes metastasis through induction of LAMP3. *Clin Cancer Res* **19**, 6126-6137
162. Nagelkerke, A., Bussink, J., Mujcic, H., Wouters, B. G., Lehmann, S., Sweep, F. C., and Span, P. N. (2013) Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response. *Breast Cancer Res* **15**, R2
163. Abcouwer, S. F., Marjon, P. L., Loper, R. K., and Vander Jagt, D. L. (2002) Response of VEGF expression to amino acid deprivation and inducers of endoplasmic reticulum stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 2791-2798
164. Lawson, W. E., Cheng, D. S., Degryse, A. L., Tanjore, H., Polosukhin, V. V., Xu, X. C., Newcomb, D. C., Jones, B. R., Roldan, J., Lane, K. B., Morrissey, E. E., Beers, M. F., Yull, F. E., and Blackwell, T. S. (2011) Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 10562-10567
165. Tanjore, H., Lawson, W. E., and Blackwell, T. S. (2013) Endoplasmic reticulum stress as a pro-fibrotic stimulus. *Biochimica et biophysica acta* **1832**, 940-947
166. Chiang, C. K., Hsu, S. P., Wu, C. T., Huang, J. W., Cheng, H. T., Chang, Y. W., Hung, K. Y., Wu, K. D., and Liu, S. H. (2011) Endoplasmic reticulum stress implicated in the development of renal fibrosis. *Mol Med* **17**, 1295-1305
167. Mencin, A., Seki, E., Osawa, Y., Kodama, Y., De Minicis, S., Knowles, M., and Brenner, D. A. (2007) Alpha-1 antitrypsin Z protein (PiZ) increases hepatic fibrosis in a murine model of cholestasis. *Hepatology* **46**, 1443-1452
168. Cadoret, A., Rey, C., Wendum, D., Elriz, K., Tronche, F., Holzenberger, M., and Housset, C. (2009) IGF-1R contributes to stress-induced hepatocellular damage in experimental cholestasis. *The American journal of pathology* **175**, 627-635
169. Xie, Q., Khaoustov, V. I., Chung, C. C., Sohn, J., Krishnan, B., Lewis, D. E., and Yoffe, B. (2002) Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. *Hepatology* **36**, 592-601
170. Zhang, J., Fan, Y., Zeng, C., He, L., and Wang, N. (2016) Tauroursodeoxycholic Acid Attenuates Renal Tubular Injury in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. *Nutrients* **8**
171. Sasaki, M., Yoshimura-Miyakoshi, M., Sato, Y., and Nakanuma, Y. (2015) A possible involvement of endoplasmic reticulum stress in biliary epithelial autophagy and senescence in primary biliary cirrhosis. *Journal of gastroenterology* **50**, 984-995
172. Hetz, C., Chevet, E., and Harding, H. P. (2013) Targeting the unfolded protein response in disease. *Nature reviews. Drug discovery* **12**, 703-719
173. Teske, B. F., Wek, S. A., Bunpo, P., Cundiff, J. K., McClintick, J. N., Anthony, T. G., and Wek, R. C. (2011) The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* **22**, 4390-4405
174. Fusakio, M. E., Willy, J. A., Wang, Y., Mirek, E. T., Al Baghdadi, R. J., Adams, C. M., Anthony, T. G., and Wek, R. C. (2016) Transcription factor ATF4 directs basal and stress-

induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver. *Mol Biol Cell* **27**, 1536-1551

175. Kim, R. S., Hasegawa, D., Goossens, N., Tsuchida, T., Athwal, V., Sun, X., Robinson, C. L., Bhattacharya, D., Chou, H. I., Zhang, D. Y., Fuchs, B. C., Lee, Y., Hoshida, Y., and Friedman, S. L. (2016) The XBP1 Arm of the Unfolded Protein Response Induces Fibrogenic Activity in Hepatic Stellate Cells Through Autophagy. *Sci Rep* **6**, 39342