



HAL
open science

Les microARNs comme biomarqueurs de la maladie du foie liée à l'alcool : de la préclinique à la clinique

Charles-Antoine Papillon

► **To cite this version:**

Charles-Antoine Papillon. Les microARNs comme biomarqueurs de la maladie du foie liée à l'alcool : de la préclinique à la clinique. Sciences agricoles. Université de Picardie Jules Verne, 2019. Français. NNT : 2019AMIE0021 . tel-03638114

HAL Id: tel-03638114

<https://theses.hal.science/tel-03638114>

Submitted on 12 Apr 2022

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

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



Thèse de Doctorat

*Mention Biologie-Santé
Spécialité Addictologie*

présentée à l'*Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Charles-Antoine PAPILLON

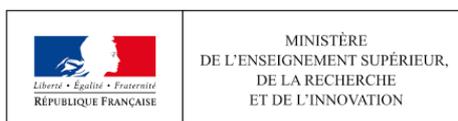
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*Les microARNs comme biomarqueurs de la maladie du foie
liée à l'alcool : De la préclinique à la clinique*

Soutenue le 26 novembre 2019 après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

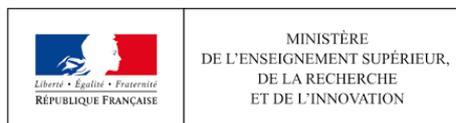
M. Denis CHATELAIN, PU-PH, UPJV
M. Peter STARKEL, PU-PH, UCLouvain
M. Romain MOIRAND, PU-PH, Rennes 1
M. Nicolas RAMOZ, CR1, Paris-Descartes 5
M. Hakim HOUCHI, MD PhD, UPJV
M. Eric NGUYEN-KHAC, PU-PH, UPJV
M. Mickaël NAASSILA, Professeur, UPJV

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Invité





Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein du Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances (GRAP INSERM U1247), dirigé par le Pr NAASSILA Mickael.



L'ensemble de ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, qui m'a permis, grâce à une allocation de recherches, de me consacrer pleinement à l'élaboration de cette thèse.



Les travaux de cette thèse ont été financés par l'Institut National de la Santé et de la Recherche (INSERM) et l'Université de Picardie Jules Verne.

Que tous soient remerciés de leur soutien.

Remerciements

Avant toute chose, mes premiers remerciements sont dédiés aux membres de mon jury :

Aux Pr Starkel et Pr Moirand qui me font tous deux l'honneur de participer à mon jury de thèse en tant que rapporteurs. Recevez toute ma gratitude pour l'intérêt que vous portez à mon travail.

Pour le Pr Chatelain et le Dr Ramoz qui répondent pour la 3^{ème} fois à mon appel. Soyez chaleureusement remerciés pour votre implication dans mes comités de suivi de thèse, pour vos conseils et votre écoute, pour votre aide et pour avoir accepté de m'accompagner durant ma thèse jusqu'à cette dernière étape.

A mes encadrants, le Pr Nguyen-Khac, le Pr Naassila et le Dr Houchi. Merci pour votre présence, vos conseils, votre soutien, vos relectures, ... Je vous dois une statue. C'est grâce à vous que j'ai aujourd'hui l'opportunité d'écrire une thèse, que j'ai pu participer à des événements comme MT180, que j'ai eu l'occasion d'aller à tant de congrès scientifiques de hautes volées. Il est difficile de résumer 7 ans de relation en un blème paragraphe mielleux. Merci.

Viennent ensuite les remerciements à tous les membres du GRAP ! Après 7 années parmi vous, j'ai eu le temps d'en croiser des gens géniaux. A commencer par tous mes collègues de bureau – là aussi, j'en ai vu tourner du monde – allant des plus anciens comme les ex-thésards et futurs médecins Fabien et Benoit, du grand scout de talent Michel, de mon fidèle partenaire de labo El Romano (mince ce que ça me manque les extractions sur des airs de Shaka ou de QOTSA), de Sophie-les-bons-conseils, et enfin la nouvelle génération qui monte et nous remplace tous...

Je tiens à remercier chaque membre du labo, que ce soit les membres de toujours comme Olivier, Catherine et Jérôme. Aux anciens qui y ont fait un passage remarqué comme Rémi, Carmen, Victor, les stagiaires qui nous nourrissaient de gâteaux maisons, les apprentis chercheurs qui nous nourrissaient de bonbons. Enfin à tous les nouveaux qui nous ont rejoints depuis, et dans cette catégorie comment ne pas citer Greg. Comparses d'études (académiques)

et d'études (scientifiques), on en aura vu des choses ensemble durant ces 6 dernières années, des galères aux bonheurs incommensurables... Merci !

N'oublions pas la glue de ce laboratoire, la secrétaire la plus efficace du monde (elle fait même des manip !), encore merci pour tout ce que tu as fait pour moi. Grâce à toi j'ai même cru pouvoir guérir ma phobie administrative.

Et parce qu'une thèse ça ne s'écrit pas que dans un laboratoire, il y a aussi tous ceux qui m'ont supporté en dehors du CURS.

Tout d'abord merci aux amis. Pour les festivals et concerts, les ninja run et le badminton, les vacances entre 4 potes qui ramènent chaque année plus de monde, les soirées GOT ou jeux, les balades en vélo ou à la plage, les flims et séries classiques, les débats politiques, les rimes en -AL, les BBQ, les raclettes, les souvenirs, ... Elle.

Y aura fallu que j'aie vous chercher dans un autre labo, mais bon sang que ça valait le coup. Tout commence par Caro, la meilleure pire entremetteuse ; Gaspard « Monsieur Sport » Guevara ; la meilleure coloc du monde : Simon et Boris et Vitto ; la nouvelle meilleure coloc Boris, Vianney et José ; les CléClé ; Damien, 24, Abos, ...

Et enfin, la famille. Parce que je ne suis pas le plus éloquent qu'il soit, et pourtant ma gratitude à votre rencontre n'a pas de limites. Je ne serai jamais capable de payer ma dette envers tous les sacrifices et les heures innombrables que vous faites pour Paloma et moi. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir poussé et soutenu dans mes études en m'offrant toutes les opportunités qu'on puisse demander. Vous m'honorez par la fierté que vous m'accordez.

Et puisque l'on parle de famille, à Olivia. Grâce à toi on a enfin pu commencer la nôtre en accueillant Vlada. Merci de me soutenir à 1000% quoi que je fasse ou entreprenne, de ton empathie, de nos moments ludiques, de tes p'tites folies, ... Je suis tellement impatient de voir ce que l'avenir nous apportera.

Liste des travaux et publications

Articles – Revues nationales à comité de lecture

Nguyen-Khac E, Dejour V, Sarba R, Yzet T, Chatelain D, Marcq I, Chivot C, **Papillon CA**, Attencourt C, Houchi H. **Severe Acute Alcoholic Hepatitis**. *Presse Med* 2018 vol 47, issue 7 <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2018.05.013> (IF 0,908).

Nguyen-Khac E, Dejour V, Sarba R, Yzet T, Turpin J, Chatelain D, Marcq I, Chivot C, Maizel J, **Papillon CA**, Attencourt C, Houchi H. **Hépatite alcoolique aiguë sévère**. *Méd Intensive Réa* 2018 vol 27, numéro 06, page 510-521 <https://doi.org/10.3166/rea-2018-0069>.

Articles – Revues internationales à comité de lecture

Papillon CA, Buttolo R, Marcq I, Houchi H, Naassila M, Nguyen-Khac E. **Circulating micro-ARNs as biomarkers of alcohol liver disease and hepatocellular carcinoma**. *Journal of Hepatology*. April 2018 vol 68, supp 1, page S648 [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(18\)31552-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(18)31552-6) (IF 14,911).

Papillon CA*, Persyn W*, Houchi H*, Guillaumont C, Dervaux A, Naassila M. **Ethanol intake and sensitivity to the anxiolytic effect of ethanol in alpha-synuclein mutant mice**. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. Aug 2018. doi: 10.1111/acer.13875 (IF 3.183).

Papillon CA, Buttolo R, Naassila M, Nguyen-Khac E, Houchi H. **Circulating micro-RNAs as biomarkers of alcohol liver disease and hepatocellular carcinoma**. En attente de soumission.

Nguyen-Khac E, **Papillon CA**, Buttolo R, Dreher ML, Naassila M, Houchi H. **PNPLA3 gene polymorphism in severe alcoholic hepatitis: a risk factor for mortality**. En attente de soumission.

Dahache K, Houchi H, **Papillon CA**, Rose-Robert F, Picard C, Diouf M, Naassila M, Nguyen-Khac E. **Diagnostic value of serum Lactoferrin in severe acute alcohol hepatitis**. En attente de soumission.

Communications orales

Actualités du réseau National Alimentation Cancer Recherche et de la Fondation ARC contre le cancer 2017 :

Papillon CA, Buttolo R, Naassila M, Nguyen-Khac E, Houchi H. Circulating micro-RNAs as biomarkers of alcohol liver disease and hepatocellular carcinoma.

Communications flash

Research Society on Alcoholism 2019 :

Papillon CA, Marie C, Fouquet G, Houchi H, Nguyen-Khac E, Naassila M, Marcq I. *Liver cancer aggressiveness induced by chronic alcohol exposure is reversed by alcohol withdrawal : face validity of an in vitro model.*

Concours Ma Thèse en 180 secondes 2018

Journée Amiénoise de la Recherche en Santé 2017 :

Papillon CA, Fouquet G, Marie C, Debuysscher V, Naassila M, Houchi H, Nguyen-Khac E, Bouhlal H, Marcq I. *L'inhibition du récepteur SLAMF3 : mécanisme d'hépatocarcinogénèse induit par l'alcool.*

Journées du Cancéropôle Nord-Ouest 2017 :

Papillon CA, Buttolo R, Naassila M, Nguyen-Khac E, Houchi H. *MicroARNs circulants comme biomarqueurs du CHC d'origine alcoolique.*

Journée des Jeunes Chercheurs UPJV-URCA-Beauvais 2017 :

Papillon CA, Fouquet G, Simoes Eugenio M, Borges Cardoso V, Debuysscher V, Naassila M, Houchi H, Nguyen-Khac E, Bouhlal H, Marcq I. *Implication du récepteur SLAMF3 dans la résistance au traitement chimiothérapeutique du Carcinome Hépatocellulaire et effets d'une exposition à l'alcool.*

Journée Amiénoise de la Recherche en Santé 2016 :

Papillon CA, Buttolo R, Naassila M, Nguyen-Khac E, Houchi H. *MicroARNs circulants comme biomarqueurs dans la maladie alcoolique du foie.*

Journée des Jeunes Chercheurs UPJV-URCA-Beauvais 2016 :

Papillon CA, Batel P, Daoust M, Gorwood P, Naassila M, Houchi H. *Intérêt du polymorphisme rs1806201 du gène GRIN2B comme marqueur de la sévérité du sevrage alcoolique. Prix de la meilleure communication affichée.*

LARC Neurosciences Network 2015 :

Papillon CA, Batel P, Daoust M, Gorwood P, Naassila M, Houchi H. *The rs1806201 polymorphism of the GRIN2B gene as a marker of alcohol withdrawal severity.*

Communications affichées

European Society for Biomedical Research on Alcoholism (ESBRA) 2019 :

Papillon CA, Buttolo R, Marie C, Fouquet G, Marcq I, Naassila M, Nguyen-Khac E, Houchi H. *Alcohol effect on microRNA production and release in alcohol-related liver disease : from a cellular model to a human study.*

Research Society on Alcoholism 2019 :

Papillon CA, Marie C, Fouquet G, Houchi H, Nguyen-Khac E, Naassila M, Marcq I. *Liver cancer aggressiveness induced by chronic alcohol exposure is reversed by alcohol withdrawal : face validity of an in vitro model.*

Journées de la Société Française en Alcoologie 2019 :

Marié C, **Papillon CA**, Fouquet G, Houchi H, Nguyen-Khac E, Naassila M, Marcq I. *Modèle cellulaire de carcinome hépatocellulaire d'origine alcoolique : impact de l'exposition chronique à l'éthanol et du sevrage sur l'agressivité du cancer.*

EASL, the International Liver Congress 2018 :

Papillon CA, Buttolo R, Marcq I, Houchi H, Naassila M, Nguyen-Khac E. *Circulating micro-ARNs as biomarkers of alcohol liver disease and hepatocellular carcinoma.*

Journées des Jeunes Chercheurs, Fondation ARC contre le cancer 2017 :

Papillon CA, Buttolo R, Naassila M, Nguyen-Khac E, Houchi H. *MicroARNs circulants comme biomarqueurs du CHC d'origine alcoolique.*

Journée Amiénoise de la Recherche en Santé 2017 :

Papillon CA, Fouquet G, Marie C, Debuyscher V, Naassila M, Houchi H, Nguyen-Khac E, Bouhlal H, Marcq I. *L'inhibition du récepteur SLAMF3 : mécanisme d'hépatocarcinogénèse induit par l'alcool.*

Journées du Cancéropôle Nord-Ouest 2017 :

Papillon CA, Buttolo R, Naassila M, Nguyen-Khac E, Houchi H. *MicroARNs circulants comme biomarqueurs du CHC d'origine alcoolique.*

Journée Jeunes Chercheurs UPJV-URCA-Beauvais 2017 :

Papillon CA, Fouquet G, Simoes Eugenio M, Borges Cardoso V, Debuyscher V, Naassila M, Houchi H, Nguyen-Khac E, Bouhlal H, Marcq I. *Implication du récepteur SLAMF3 dans la résistance au traitement chimiothérapeutique du Carcinome Hépatocellulaire et effets d'une exposition à l'alcool.*

Journées de la Société Française en Alcoologie 2017 :

Papillon CA, Buttolo R, Naassila M, Nguyen-Khac E, Houchi H. *MicroARNs circulants comme biomarqueurs dans la maladie alcoolique du foie.*

Journée Amiénoise de la Recherche en Santé 2016 :

Papillon CA, Buttolo R, Naassila M, Nguyen-Khac E, Houchi H. *MicroARNs circulants comme biomarqueurs dans la maladie alcoolique du foie.*

International Society of Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA) - European Society for Biomedical Research on Alcoholism (ESBRA) 2016 :

Papillon CA, Buttolo R, Naassila M, Nguyen-Khac E, Houchi H. *Circulating microRNAs biomarkers in alcohol liver disease.*

Journées de la Société Française en Alcoologie 2016 :

Papillon CA, Batel P, Daoust M, Gorwood P, Naassila M, Houchi H. *Intérêt du polymorphisme rs1806201 du gène GRIN2B comme marqueur de la sévérité du sevrage alcoolique.*

Journée Jeunes Chercheurs UPJV-URCA-Beauvais 2016 :

Papillon CA, Batel P, Daoust M, Gorwood P, Naassila M, Houchi H. *Intérêt du polymorphisme rs1806201 du gène GRIN2B comme marqueur de la sévérité du sevrage alcoolique.*

Prix de la meilleure communication affichée.

LARC Neurosciences Network 2015 :

Papillon CA, Batel P, Daoust M, Gorwood P, Naassila M, Houchi H. *The rs1806201 polymorphism of the GRIN2B gene as a marker of alcohol withdrawal severity.*

Liste des formations et activités d'enseignement

Formations

- Formation en médiation scientifique (Université Paris Diderot, 2015)
- Formation en spectrométrie de masse (Université de Picardie Jules Verne, 2015)
- Formation en expérimentation animale (Université de Picardie Jules Verne, 2017)
- Formation au concours Ma Thèse en 180 secondes (ComUE Lille, 2018)

Activités d'enseignement

- Travaux Dirigés sur le pH et l'équilibre acido-basique, Première Année Commune aux Etudes de Santé (PACES), 75h.
- Travaux Pratiques de Physiologie humaine, Diplôme de Formation Générale en Sciences Pharmaceutiques (DFGSP2) (45h).
- Travaux Dirigés et Pratiques de Physiologie du système cardiaque, Diplôme de Formation Générale en Sciences Pharmaceutiques (DFGSP3) (51h).

Encadrement de stagiaires

Mlle DAOUST Emma, élève de 3^{ème} au collège du Sacré Cœur de Vannes, Avril 2015 (1 semaine).

Mlle MARCHAND Constance, élève de 2nd année de D.U.T. en Génie Biologique de l'I.U.T. d'Evreux, Université de Rouen, Avril-Juin 2016 (10 semaines).

Mr BUTTOLO Romain, élève de Master 2 en Science de la Vie et de la Terre de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Université de la Sorbonne, Octobre 2015-Novembre 2016 (14 mois).

Mlle BORGES CARDOSO Virginie, élève en Master 2 Interactions Moléculaires et Recherche Thérapeutique, Université de Picardie Jules Verne, Janvier-Juin 2017 (6 mois).

Mr TAZIBET Karim, élève de Master 1 en Physiopathologie Humaine, Exploration Fonctionnelle et Imagerie et Licence 3 de Médecine, Université de Picardie Jules Verne, Mars-Juin 2017 (2 mois).

Mlle MARIE Constance, élève de Master 1 Interactions Moléculaires et Recherche Thérapeutique, Université de Picardie Jules Verne, Avril-Juin 2017 (2 mois).

Mr DUROYON Valentin, élève en 1^{ère} année de BTS Biotechnologies du Lycée Valentine LABBE, Lille, Mai-Juillet 2017 (2 mois).

Mr DUROYON Valentin, élève en 2nd année de BTS Biotechnologies du Lycée Valentine LABBE, Lille, Décembre 2017-Février 2018 (3 mois).

Mlle MARIE Constance, élève de Master 2 Interactions Moléculaires et Recherche Thérapeutique, Université de Picardie Jules Verne, Janvier-Juillet 2018 (6 mois).

Mr MARQUIS Léo, élève de 3^{ème} au collège La Providence d'Amiens, Avril 2018 (1 semaine).

Mlle BENTZ Marine, élève en Licence 3 de Biologie Humaine et Technologie de Santé, Université de Picardie Jules Verne, Avril-Juin 2018 (7 semaines).

Liste des abréviations

- 2D/3D : Deux/Trois dimensions
- AASLD : American Association for the Study of Liver Disease
- Acetyl-CoA : Acétyl-CoenzymeA
- ADH : Alcool DésHydrogénase
- AFEF : Association Française pour l'Etude du Foie
- AFP : α -fétoprotéine
- AG : Acide Gras
- ALAT : Alanine Amino Transférase
- AMPK : Adénosine MonoPhosphate-activated protein kinase
- ARN pol : ARN polymérase
- ASAT : Aspartate Amino Transférase
- AUDIT : Alcohol Use Disorders Identification Test
- BCLC : Barcelona Clinic Liver Cancer
- CCl₄ : Tétrachlorure de carbone
- CDT : Carbohydrat Deficient Transferrin
- CEF : Cellule Etoilée du Foie
- CHC : Carcinome Hépatocellulaire
- CIM-10 : Classification Internationale des Maladies, 10^{ème} édition
- CSEh : Cellules Souches Embryonnaires humaines
- CSPi : Cellules Souches Pluripotentes induites
- CYP2E1 : Cytochrome P450 2E1
- DEN : DiEthylNitrosamine
- DGCR8 : DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
- DSM : *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*
- EASL : European Association for the Study of the Liver
- γ GT : Gamma-Glutamyl Transpeptidase
- HA : Hépatite Alcoolique
- HAA : Hépatite Alcoolique Aiguë
- HES : Hématoxyline Eosine Safran

- HPH : Hépatocyte Primaire Humain
- INR : International Normalized Ratio
- kb : kilobase
- LDC : Lierber-DeCarli (régime alimentaire)
- LI-RADS : Liver Imaging Reporting and Data System
- LPS : LipoPolySaccharides
- MAF : Maladie Alcoolique du Foie / Maladie du Foie liée à l'Alcool
- MEC : Matrice Extra Cellulaire
- MELD : Model for End-stage Liver Disease
- miARN ou miR : micro-ARN
- MMP : Matrix Metallo Proteinase
- NAC : N-Acetyl Cystéine
- NASH : Non-Alcoholic SteatoHepatitis
- ncARN : ARN non-codant
- NFkB : Nuclear Factor-kappa B
- NIAAA : National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- PAL : Phosphatases Alcalines
- pb : paire de bases
- PBH : Ponction Biopsie Hépatique
- PGC-1 α : Proliferator-activated receptor-Gamma Coactivator 1 α
- PPAR α : Peroxisome Proliferator-activated Receptor α
- PNN : PolyNucléaire Neutrophile
- Pré-miARN : miARN précurseur
- Pri-miARN : miARN primaire
- Ran-GTP : Ras-related Nuclear protein couplée au GTP
- RISC : RNA Induced Silencing Complex
- RLC : RISC Loading Complex
- ROS : Reactive Oxygen Species, Espèces Réactives à l'Oxygène
- RPIB : Repérage Précoce et Intervention Brève
- SHA : StéatoHépatite Alcoolique

- SIRT1 : Silent Information Regulator 1
- SREBP1 : Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1
- SSA : Syndrome de Sevrage Alcoolique
- TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
- TGF- β : Transforming growth factor beta
- TIMP : Tissue Inhibitors of Metallo Proteinase
- TLR (2/4) : Toll Like Receptor (2/4)
- TNF α : Tumor Necrosis Factor α
- TP : Temps de Prothrombine
- TRBP : Transactivation-responsive RNA Binding Protein
- TUA : Troubles liés à l'Usage d'Alcool
- VGM : Volume Globulaire Moyen
- VHB/VHC : Virus de l'Hépatite B/C
- VPN : Valeur Prédictive Négative
- VPP : Valeur Prédictive Positive

Liste des Figures

Figure 01 : *Mortalité d'origine hépatique standardisée par rapport à l'âge en fonction de leur étiologie.*

Figure 02 : *Prévalence standardisée par rapport à l'âge des hépatopathies en fonction de leur étiologie en 2016.*

Figure 03 : *Coupe histologique de foie atteint de stéatose.*

Figure 04 : *Impact du métabolisme de l'éthanol sur le métabolisme lipidique.*

Figure 05 : *Coupe histologique de foie atteint de SHA.*

Figure 06 : *Mécanismes impliqués dans l'activation par l'éthanol des CEF à l'origine de la fibrose hépatique.*

Figure 07 : *Coupe histologique de foie atteint de fibrose.*

Figure 08 : *Aspect macroscopique d'un foie fibrosé, allant du stade F0 au stade F4 puis le CHC.*

Figure 09 : *Coupe histologique de foie atteint de cirrhose et stéatose.*

Figure 10 : *Risque annuel de complications et de mortalité en fonction du stade de la cirrhose et l'évolution de la pathologie.*

Figure 11 : *Coupe histologique de foie atteint de CHC.*

Figure 12 : *Algorithme décisionnel de surveillance et de diagnostic du CHC par l'AASLD.*

Figure 13 : *Algorithme décisionnel de la Barcelona Clinic Liver Cancer concernant la prise en charge thérapeutique du CHC.*

Figure 14 : *Réseau protéique régulé par le miR-122 chez des souris KO comparé à des souris normales.*

Figure 15 : *Biogénèse des miARNs.*

Figure 16 : *Modèle canonique de la fixation d'un miARN sur un ARNm.*

Figure 17 : *Modèle non-canonique de la fixation d'un miARN sur un ARNm.*

Figure 18 : *Résumé des miARNs sélectionnés et leurs implications dans les voies physiopathologiques de la MAF et du CHC.*

Figure 19 : *Changements morphologiques observées en imagerie optique chez des cellules exposées chroniquement à 0 ou 80mM d'éthanol.*

Figure 20 : *Mesures des quantités de miARNs produites par million de cellules Huh-7 exposées chroniquement à 0 ou 80mM d'éthanol.*

Figure 21 : *Mesures des quantités de miARNs excrétées par million de cellules Huh-7 exposées chroniquement à 0 ou 80mM d'éthanol.*

Figure 22 : *Frise chronologique correspondant à l'expérimentation animale.*

Figure 23 : *Coupes histologiques de foies de souris contrôles exposées ou non à l'alcool.*

Figure 24 : *Courbe de survie représentant la mortalité induite par le protocole d'exposition à l'alcool.*

Figure 25 : *Quantités de miARNs circulants par mL de plasma sanguin chez les souris exposées à l'alcool comparées à celle de plasma sanguin issu de souris contrôles non-exposées.*

Table 01 : *Récapitulatif des quantifications de miARNs intracellulaires.*

Table 02 : *Récapitulatif des quantifications de miARNs extracellulaires.*

Table 03 : *Récapitulatif des quantifications de miARNs dans le plasma sanguin de souris.*

Table des matières

Remerciements	4
Liste des travaux et publications	7
Articles – Revues nationales à comité de lecture	7
Articles – Revues internationales à comité de lecture.....	7
Communications orales.....	8
Communications flash	8
Communications affichées	9
Liste des formations et activités d'enseignement	12
Formations	12
Activités d'enseignement	12
Encadrement de stagiaires	12
Liste des abréviations.....	14
Liste des Figures	17
Résumé Substantiel.....	23
Chapitre Un : Introduction	29
1. La Maladie du Foie liée à l'Alcool	31
1.1 Maladie du Foie liée à l'alcool	31
1.2 Mortalité issue d'une consommation excessive d'alcool	31
1.3 Epidémiologie.....	32
1.4 Physiopathologie	35
2. Les micro-ARNs (miARNs).....	56
2.1 Définition	56
2.2 Nomenclature.....	57
2.3 Biogénèse du miARN	58
2.4 Fonctionnement des miARNs.....	61

3. miARNs et MAF	65
3.1 L'intérêt clinique des miARNs	65
4. Modélisation de la MAF	78
4.1 La modélisation <i>in vitro</i>	78
4.2 La modélisation <i>in vivo</i>	82
Objectifs	91
Chapitre Deux : Matériels et Méthodes	93
1. Modélisation Cellulaire	95
1.1 Culture cellulaire	95
1.2 Exposition à l'alcool	95
1.3 Echantillonnage	96
2. Modélisation Animale	97
2.1 Animaux	97
2.2 Protocole d'exposition à l'alcool	98
2.3 Prélèvements	99
3. Echantillons Humains	99
3.1 Patients	99
3.2 Echantillons	99
4. Extraction et quantification des miARNs	100
Extractions des miARNs	100
RTqPCR	100
5. Analyses statistiques	102
Chapitre Trois : Résultats	103
1. Modélisation Cellulaire	105
1.1 Production de miARN intracellulaire	105
1.2 Libération de miARNs dans le surnageant de cultures cellulaires	107

2. Modélisation Animale	109
2.1 Timeline	109
2.2 Aspect Histologique.....	111
2.2 Courbe de Survie	112
2.3 Quantification de miARNs circulants	113
3. Résultats Humains.....	115
Article : Circulating micro-RNAs as biomarkers of alcohol-related liver disease and hepatocellular carcinoma.....	115
Chapitre Quatre : Discussions et Conclusions.....	131
1. Modélisation Cellulaire	135
1.1 Etablissement du modèle	135
1.2 Production cellulaire des miARNs.....	136
1.3 Modèle in vitro idéal ?.....	138
2. Modélisation Animale	139
2.1 Etablissement du modèle	139
2.2 Quantification plasmatique des miARNs	140
2.3 Limites du modèle.....	141
3. Résultats Cliniques	143
4. Conclusions.....	147
5. Perspectives.....	150
Annexes	151
Bibliographie	167
Résumé.....	197
Abstract	197

Résumé Substantiel

Les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent dans la recherche de nouveaux marqueurs associés aux formes avancées de la maladie du foie liée à l'alcool (MAF) afin d'améliorer le suivi de ces patients et d'envisager des marqueurs de réponse au traitement. La MAF est composée d'un continuum de signes cliniques à la sévérité variable, généralement proportionnelle au niveau de consommation d'alcool et à la période sur laquelle ce schéma consommatoire s'étend. Bien que certaines formes de la MAF soient asymptomatiques et réversibles (stéatose, hépatite alcoolique, ...), les formes avancées de MAF induisent une morbi-mortalité importante (cirrhose, carcinome hépatocellulaire, hépatite alcoolique aiguë). En 2015 les formes sévères de la MAF représentaient près de 30% de la mortalité annuelle associée à la consommation d'alcool en France, c'est-à-dire 11 700 décès (Bonaldi and Hill, 2019).

En Europe, plus de la moitié des maladies chroniques du foie sont d'origine alcoolique (OMS, 2014a) : 60% des cirrhoses du foie, 60-80% des cancers du foie. La France est pour sa part particulièrement touchée par ce problème de santé publique. Cela s'explique en partie par une tradition viticole forte et une image festive associée à la consommation d'alcool, qui font de la France l'un des plus gros consommateurs d'alcool au monde. Or, ce sont les 20% plus gros buveurs français qui consomment plus de la moitié de la quantité d'alcool consommée annuellement en France (EASL, 2018).

Ainsi, 90 à 100% des consommateurs chroniques d'alcool développent de la stéatose hépatique (Gao and Bataller, 2011). Cependant cette forme de MAF étant asymptomatique, les patients maintiennent en général leur niveau de consommation ce qui entraîne une détérioration de l'état hépatique, avec notamment des épisodes d'hépatites alcooliques (HA) qui sont à l'origine du remplacement progressif du tissu fonctionnel par un tissu fibreux. Cet état de fibrose une fois généralisé correspond à la cirrhose, qui à ce stade peut toujours être compensée (c'est-à-dire asymptomatique) ou non. La cirrhose est la forme terminale de MAF, elle cause elle-même 335 000 décès par an au monde (IHME, 2018), cependant elle est aussi considérée comme un état précancéreux qui mène au carcinome hépatocellulaire (CHC) (Ganne-Carrié et al., 2018; Niu et al., 2016). Or, seulement 30 à 40% des CHC sont diagnostiqués à un état précoce, état où un traitement curatif peut être proposé. Cela explique pourquoi le CHC est le 3^e cancer en terme de mortalité au monde (Bray et al., 2018)

avec une médiane de survie de 16 mois pour les stades intermédiaires, 11 mois pour les CHC avancés (Llovet et al., 2008; Zhang et al., 2018a).

Dans ce contexte, il apparaît nécessaire de réaliser un suivi de la MAF afin de prendre en charge le plus rapidement possible ces formes sévères et ainsi améliorer le pronostic. A l'heure actuelle, seule l' α -fétoprotéine (AFP) sérique a passé avec succès les 5 phases de développement de biomarqueur dans le cadre d'un test non-invasif pour le repérage des patients atteints de CHC (Sengupta and Parikh, 2017). Seulement son utilisation et notamment le seuil diagnostique à utiliser font débat. En effet, des modifications des niveaux d'AFP sériques peuvent être observées en dehors du CHC (en cas d'hépatite virale en particulier) (Trevisani et al., 2001). Au seuil optimal de 15-20 ng/mL établi à partir d'analyses ROC, on observe une sensibilité de 60% et une valeur prédictive positive de 41,5% (Barletta et al., 2005; Trevisani et al., 2001). Cette sensibilité relativement faible provient d'une concentration sérique de l'AFP directement corrélée à la taille de la masse tumorale, ce qui explique que 80% des petits CHC ne provoquent pas d'augmentation des niveaux d'AFP (Trinchet and Ganne-Carrié, 2006) et que 31% des CHC avancés produisent moins de 10ng/mL (Agopian et al., 2017). Au total, c'est donc près de la moitié des CHC qui ne produisent pas d'AFP (Sengupta and Parikh, 2017).

C'est pourquoi ce travail de thèse s'intéresse aux micro-ARNs (miARNs) comme biomarqueurs de la MAF. Les miARNs sont des ARNs simple brin non-codants de 19 à 24 nucléotides (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993) avec un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de plusieurs dizaines voire centaines d'ARN messagers (He et al., 2017) pour chaque miARN. Chez l'Homme plus de 2600 miARNs ont été identifiés à ce jour, et on estime leur impact sur plus de 60% du génome (Hafner et al., 2012). Nous nous sommes ainsi basés sur la littérature scientifique et avons sélectionné à partir de celle-ci 8 miARNs pour leurs implications dans la physiopathologie hépatique (miR-122, miR-223, miR-29a et miR-212) ou dans les phénomènes de cancérogénèse (miR-155, miR-21, miR-34a et miR-126*).

Dans un modèle originale d'exposition chronique à l'alcool de cellules cancéreuses du foie (lignée Huh-7), nous nous sommes intéressés à la faisabilité d'un protocole d'extraction automatisée et de quantification de miARNs en étudiant plus particulièrement la production intracellulaire et la libération dans le milieu extracellulaire de ces miARNs après 6 mois d'exposition journalière à 80mM d'éthanol dans le milieu de culture comparativement à des cellules exposées uniquement à du milieu de culture. Nous avons ainsi observé une

augmentation de la production de tous nos miARNs d'intérêt au niveau intracellulaire mais une réduction du ratio de miARNs excrétés dans le surnageant par rapport aux miARNs produits.

Dans un second temps, afin de prendre en compte les interactions cellulaires et de tester la faisabilité de notre protocole à partir de miARNs circulants dans le plasma sanguin nous avons alors utilisé un modèle intégré en utilisant un protocole d'induction de la MAF chez la souris non-consanguine adulte. Ce modèle original consiste en une exposition chronique à des vapeurs d'éthanol (intoxication passive et contrôlée induisant une dépendance physique) complétée par des expositions de type binge (d'injections intra-péritonéales d'alcool) et de lipopolysaccharides (par gavage) afin de favoriser l'inflammation hépatique à l'origine de la MAF. Nos résultats démontrent la faisabilité d'un tel protocole, et plusieurs miARNs sont sécrétés de manière significativement plus élevée dans le plasma d'animaux exposés à l'alcool. Ces résultats, bien que retrouvés dans un modèle de MAF moins sévère que le CHC, qui est la pathologie ciblée par nos miARNs présélectionnés, s'expliquent aisément par les différentes procédures auxquelles les souris ont été exposées et les voies physiopathologiques ciblées par nos traitements.

Pour conclure ce travail, nous avons donc quantifié ces miARNs dans le sérum de patients atteints de CHC d'origine alcoolique, de patients atteints de MAF sans CHC et de patients sans atteintes hépatiques. Nous observons que chacun des miARNs étudiés sont associés avec la MAF, et plus particulièrement que les miR-122 et miR-155 sont significativement associés au CHC lié à l'alcool comparativement au groupe MAF. Les miARNs étant de manière générale faiblement spécifiques, nous proposons d'utiliser des combinaisons de différents miARNs afin d'établir des profils pertinents en utilisant des miARNs spécifiques aux voies de signalisations mises en œuvre durant le développement physiopathologique. Nos résultats montrent notamment que ces combinaisons de miARNs augmentent les caractéristiques de notre test, notamment la valeur prédictive positive.

L'introduction de ce manuscrit présente le continuum pathologique de la MAF ainsi que sa physiopathologie et épidémiologie, puis les miARNs et leur intérêt clinique dans le cadre de la MAF. Enfin nous aborderons la modélisation de la MAF *in vitro* et *in vivo* avant d'exposer nos questions scientifiques et les méthodologies utilisées au cours de ces travaux. Les résultats

humains seront présentés sous forme d'article. S'en suivra une discussion sur nos résultats et la proposition de perspectives.

Chapitre Un : Introduction



Campagne de prévention par Ecovia

1. La Maladie du Foie liée à l'Alcool

1.1 Maladie du Foie liée à l'alcool

Le métabolisme de l'alcool absorbé est réalisé à 90-98% par le couple hépato-gastrique (Lieber, 2005). Le foie à lui seul métabolise jusqu'à 90% de l'alcool absorbé, ce qui en fait l'un des organes les plus touchés par les dommages de l'alcool, et donc l'une des comorbidités aux troubles liés à l'usage de l'alcool (TUA) fréquente (Mann et al., 2003).

Ces dommages hépatiques peuvent avoir des sévérités diverses, généralement proportionnelles au niveau de consommation et à la période sur laquelle elle s'étend (Gao and Bataller, 2011). On distingue ainsi plusieurs signes cliniques associés à une consommation chronique d'alcool : la stéatose, l'hépatite alcoolique, la fibrose/cirrhose ou encore le cancer primaire du foie (Thursz et al., 2018). Tous ces troubles hépatiques issues d'une consommation d'alcool sont regroupés sous l'appellation de maladie du foie liée à l'alcool, plus communément appelée maladie alcoolique du foie (MAF) (les 2 termes seront utilisés indistinctement au cours de ce manuscrit).

En raison de son rôle clé dans le métabolisme de l'alcool, le foie est particulièrement touché par les effets délétères de l'alcool, ce qui est à l'origine de la MAF. Il s'agit d'un continuum pathologique à la sévérité proportionnelle aux quantités d'alcool consommées et à la durée sur laquelle cette consommation s'étend.

1.2 Mortalité issue d'une consommation excessive d'alcool

D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), les TUA étaient à l'origine de 3,3 millions de décès par an en 2014 (OMS, 2014b). Cela représente 5,9% de la mortalité mondiale. L'année suivante en France, l'alcool tuait environ 41 000 personnes (Bonaldi and Hill, 2019).

Cette estimation de la mortalité prend en compte la fraction attribuable à l'alcool dans environ 400 intitulés de la classification internationale des maladies (CIM-10) réalisée par l'OMS. Parmi les causes de mortalité principales associées à l'alcool, on peut citer les comorbidités cardiovasculaires (7%), les cancers (10%), les accidents et suicides (14%) ou encore les maladies digestives (29%).

Il est à noter une baisse de la mortalité attribuable à l'alcool en France entre 2009 et 2015 de 16,2% (-7968 décès). Or la mortalité associée à une forme de la maladie alcoolique du foie (MAF) est en progression de 19,7% (+2309 décès) sur cette même période (Bonaldi and Hill, 2019; Guérin et al., 2013). Prise à part, la maladie alcoolique du foie représentait 28,5% de la mortalité liée à l'alcool en France en 2015.

La MAF est donc une comorbidité sévère induisant une surmortalité importante chez les personnes consommant chroniquement de l'alcool.

1.3 Epidémiologie

D'après les données du Global Burden Disease, 1,26 millions de personnes sont mortes en 2016 des suites d'une cirrhose ou d'une pathologie chronique du foie (IHME, 2018) et l'Europe est l'une des régions les plus touchées (Blachier et al., 2013). Or, d'après les chiffres de l'OMS sur la mortalité en Europe, 41% des décès issus d'une défaillance hépatique étaient d'origine alcoolique tandis que 46% étaient d'origine inconnue, et donc probablement en partie au moins la résultante d'une forme de MAF (OMS, 2016) (Voir Figure 01).

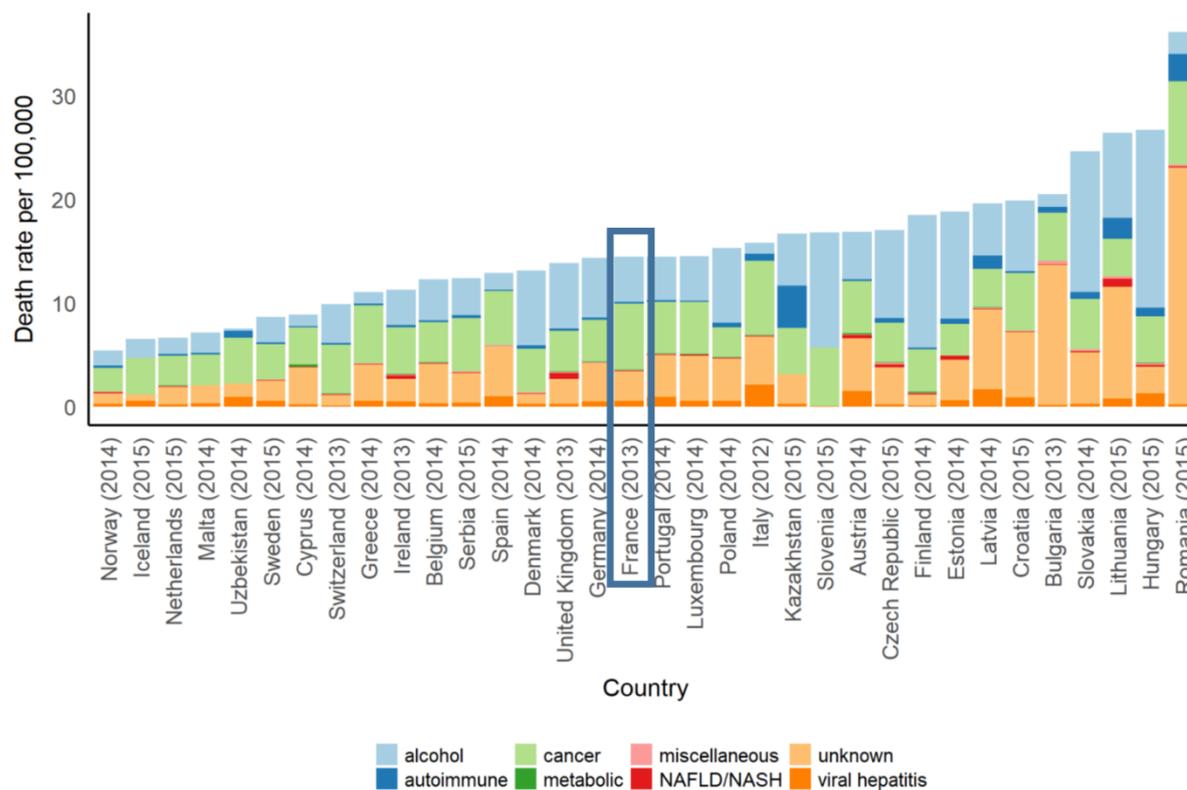


Figure 01 : Mortalité d'origine hépatique standardisée par rapport à l'âge en fonction de leur étiologie. Basée sur les données de l'OMS sur la mortalité, issue de (EASL, 2018).

Les chiffres exacts sont difficiles à obtenir, notamment dû à l'aspect asymptomatique des formes non-sévères de la MAF. De plus, d'après l'*European Association for the Study of the Liver* (EASL), il s'écoule en moyenne plus de 10 ans entre le développement d'un TUA et la consultation avec un spécialiste (Thursz et al., 2018). Pour l'OMS en 2014, se sont 60% des cirrhoses du foie en Europe qui résultaient d'une consommation chronique d'alcool (OMS, 2014a) (Voir Figure 02). En France ce taux dépassait les 70% (73,1% pour les hommes et 71,9% pour les femmes).

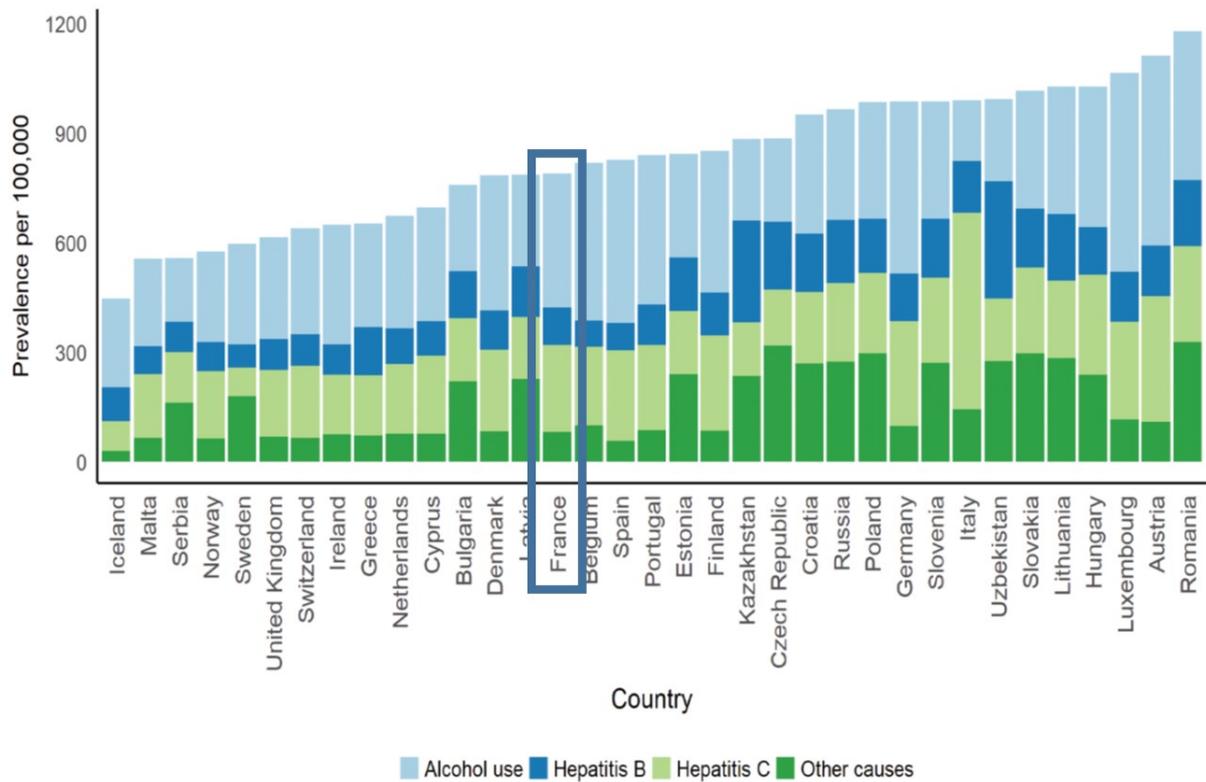


Figure 02 : *Prévalence standardisée par rapport à l'âge des hépatopathies en fonction de leur étiologie en 2016. Basée sur les données du Global Burden of Disease, issue de (EASL, 2018).*

La MAF étant un continuum pathologique à la sévérité variable, l'incidence de ses différentes formes est en général corrélée à la durée d'exposition et aux quantités d'alcool consommées. Ainsi 90 à 100% des personnes consommant chroniquement de l'alcool développent de la stéatose hépatique (Gao and Bataller, 2011; Roth and Quin, 2019; Seitz et al., 2018). Mais dans cette même population, seulement 20 à 40% développent une forme plus sévère de la MAF avec l'apparition de fibrose hépatique. Cette fibrose tend à se généraliser vers une cirrhose dans 8 à 20% de ces cas. En 2016, 335 000 personnes seraient décédées d'une cirrhose d'origine alcoolique (IHME, 2018).

En plus de ces formes progressives de MAF, une forme aiguë peut s'ajouter au bilan clinique, on parle d'hépatite alcoolique (Maddrey, 2000). Cette pathologie peut se présenter sous sa forme pauci symptomatique réversible, c'est-à-dire avec peu de symptômes cliniques et sans insuffisance hépatique (Nguyen-Khac et al., 2014). La superposition d'une hépatite alcoolique avec une forme avancée de la MAF peut engendrer l'hépatite alcoolique aiguë sévère (HAA)

(Nguyen-Khac et al., 2018). L'HAA se développe à 70-90% sur un foie cirrhotique et est caractérisée par une importante surmortalité à court terme (Nguyen-Khac et al., 2018; Seitz et al., 2018).

Enfin, la cirrhose est considérée comme un état précancéreux puisque le risque de développer un cancer primitif du foie chez ces patients est augmenté d'un facteur 5, ce qui représente 2 à 10% des patients atteints de cirrhose du foie (Gao and Bataller, 2011; Seitz et al., 2018). En 2016, 245 000 personnes seraient décédées d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) lié à l'alcool (IHME, 2018).

En Europe la consommation chronique d'alcool est le premier facteur de risque au développement d'une maladie chronique du foie. Il s'agit de pathologies induisant une mortalité significative, et ce notamment du fait d'un développement silencieux de la pathologie qui s'étend sur plusieurs années jusqu'à atteindre des formes sévères issues d'une décompensation brutale du foie (cirrhose, HAA, cancer).

1.4 Physiopathologie

La physiopathologie de la MAF a été étudiée et décrite de manière extensive (Gao and Bataller, 2011; Lefkowitz, 2005; Lieber, 2005; Maddrey, 2000; Muller, 2006; Rehm et al., 2010; Roth and Quin, 2019; Seitz et al., 2018; Teschke, 2018; Thursz et al., 2018).

Pour résumer, la MAF est la résultante d'un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) secondaire au métabolisme de l'alcool qui induit des dégâts à l'ADN ainsi qu'à la cellule. Cette souffrance cellulaire est à l'origine du recrutement du système immunitaire qui engendre un état inflammatoire. Le maintien d'une consommation chronique d'alcool engendre l'apparition d'un continuum pathologique en lien avec la durée d'exposition. Cela va de la stéatose jusqu'à la fibrose/cirrhose, et l'apparition de signes cliniques tels que l'hépatite alcoolique et le carcinome hépatocellulaire qui peuvent se superposer.

1.4.1 Stéatose

La stéatose hépatique est la première apparition clinique témoignant d'une consommation chronique d'alcool. Cette forme asymptomatique et réversible de MAF (Zeitoun et al., 2014) apparaît chez presque toutes les personnes ayant une consommation chronique d'alcool (Gao and Bataller, 2011). La stéatose hépatique correspond à l'accumulation de triglycérides au sein des hépatocytes sous forme de gouttelettes lipidiques (voir les indicateurs de la Figure 03).

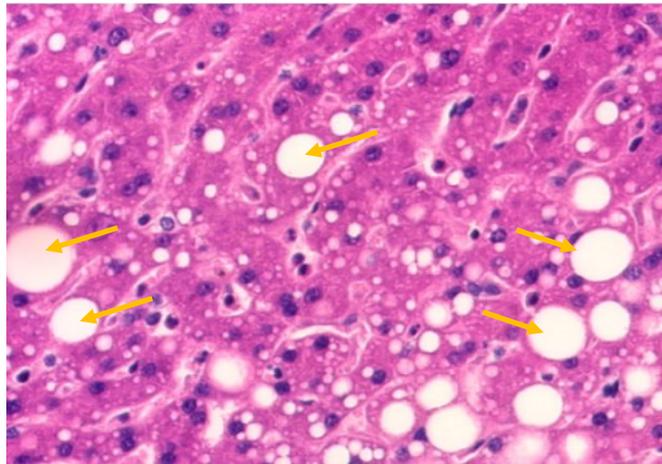


Figure 03 : Coupe histologique de foie atteint de stéatose. Coloration Hématoxyline Eosine Safran (HES), courtoisie du Pr D. Chatelain (CHU Amiens-Picardie). Les gouttelettes lipidiques, dont certains exemples sont indiqués par des flèches, apparaissent optiquement vides secondairement à la dissolution des graisses par les fixateurs utilisés.

L'accumulation de lipides (triglycérides, phospholipides ou encore les esters de cholestérols) lors de ce phénomène est le résultat cumulatif des effets directs et indirects de l'éthanol et de ses métabolites (Figure 04). Le facteur principal étant la dérégulation du métabolisme lipidique. Cette dérégulation passe par la stimulation de l'expression de gènes lipogéniques (You et al., 2002, 2004) ainsi que l'inhibition de la β -oxydation des acides gras par l'éthanol et l'acétaldéhyde (de manière directe et indirecte) (Galli et al., 2001; Murphy, 2013; Zhong and Lemasters, 2018). A cela s'ajoute la production d'acétate lors du métabolisme de l'acétaldéhyde qui sera lui-même à l'origine d'acétyl-coenzyme-A (Acétyl-CoA) qui pourra être utilisé dans la production d'acide gras (Mao et al., 2006).

Hépatocyte

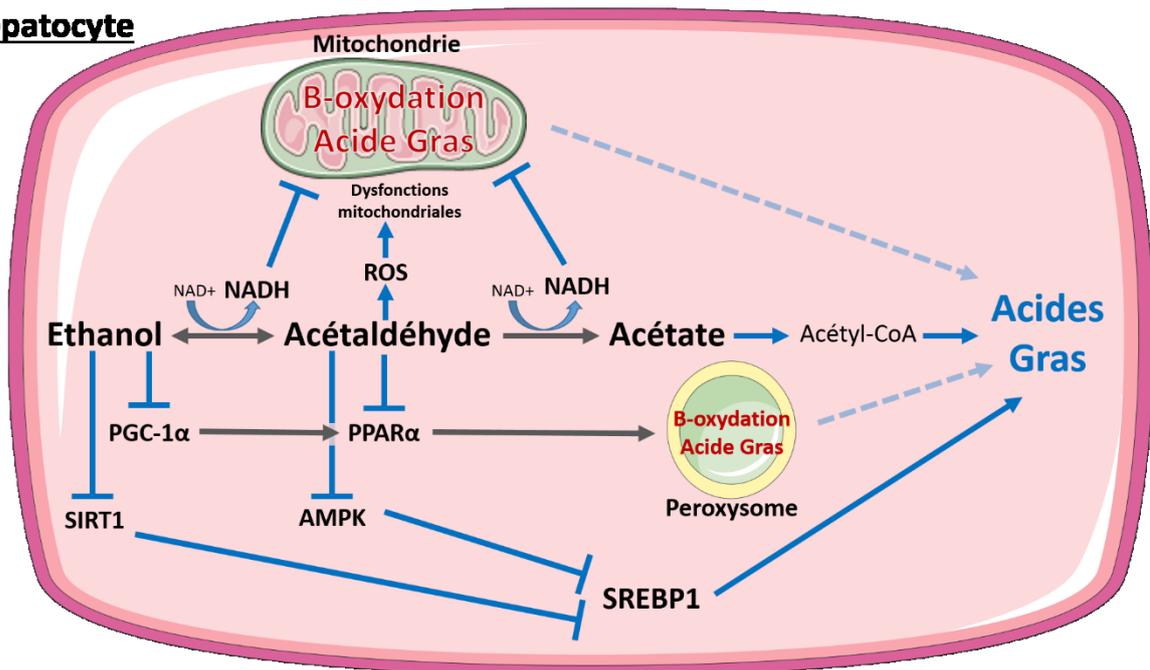


Figure 04 : Impact du métabolisme de l'éthanol sur le métabolisme lipidique. La consommation chronique d'alcool provoque une accumulation de triglycérides sous forme de macrovésicules lipidiques au sein du cytoplasme hépatocytaire via de multiples dérégulations des voies de métabolisation des lipides, notamment la β -oxydation mitochondriale ou des peroxyosomes, la production d'Acétyl-CoenzymeA (Acétyl-CoA) ou la levée d'inhibition de facteurs de transcription.

Le métabolisme de l'éthanol et de son métabolite, l'acétaldéhyde, sont à l'origine de très nombreuses altérations qui induisent une surproduction d'acide gras tout en réduisant leur transport et leur élimination. Cette accumulation, induite par plusieurs années de consommation chronique d'alcool est à l'origine du premier signe clinique de la MAF : la stéatose. C'est-à-dire l'accumulation sous forme de gouttelettes lipidiques d'acide gras dans l'hépatocyte. Cette pathologie est asymptomatique et réversible avec l'arrêt de la consommation d'alcool.

1.4.2 L'accumulation de ROS

Tout comme l'activation des voies lipogéniques, la métabolisation de l'éthanol et de ses métabolites vont induire directement et indirectement une production excessive d'espèces réactives oxygénées (ROS). Cette surproduction, qu'elle soit issue du métabolisme de l'acétaldéhyde ou de la dérégulation du métabolisme mitochondrial, excède les capacités anti-oxydantes des enzymes hépatiques (Pessayre et al., 2004). Le surplus de ROS ne pouvant être tamponné est à l'origine d'un environnement hépatique pro-inflammatoire, de dommages à l'ADN, de l'induction de nécrose ou d'apoptose hépatocellulaire ainsi que l'activation des macrophages résidents du foie – les cellules de Kupffer – induisant un environnement inflammatoire (Thursz et al., 2018; Wan et al., 2014).

Cette accumulation de ROS est elle-même un facteur impliqué dans le développement d'une stéatose mais peut aussi engendrer un ballonnement hépatocytaire – c'est-à-dire un gonflement des cellules du foie avec une raréfaction du cytoplasme qui la compose –, l'apparition de neutrophiles infiltrés ainsi que l'agglomération de filaments intermédiaires (Toivola et al., 2004). Ces signes sont caractéristiques de l'hépatite alcoolique (HA) et apparaissent lors de stéatohépatite alcoolique (SHA) (voir Figure 5), qui est une forme de MAF généralement asymptomatique diagnostiquée de manière fortuite.

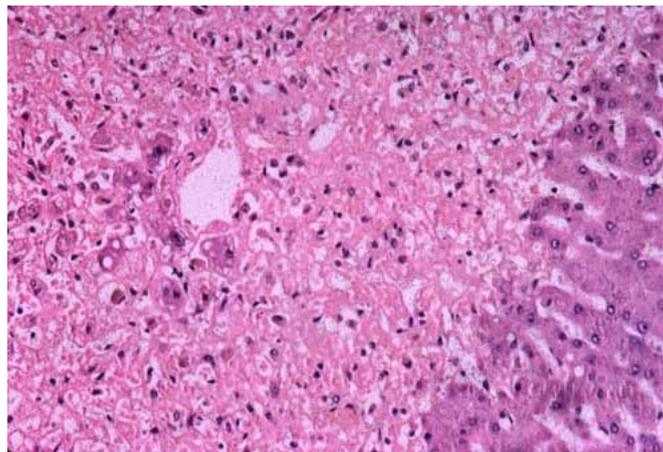


Figure 05 : Coupe histologique de foie atteint de SHA. Coloration HES, courtoisie du Pr D. Chatelain (CHU Amiens-Picardie).

Dans le cas de la MAF, certaines oxydases comme les cytochromes P450 et notamment la CYP2E1 sont aussi impliquées dans cette production de ROS (Lu et al, 2008 ; Lu et al, 2018). En effet, suite à une consommation excessive d'alcool, la saturation de l'ADH afin de métaboliser l'éthanol induit l'activation de CYP2E1. CYP2E1 présente un Km relativement élevé pour l'éthanol, 8 à 10mM, ce qui explique son activation tardive ou lors d'important niveaux de consommation (Lieber, 2005). Or la métabolisation de l'éthanol par CYP2E1 produit de manière directe du peroxyde d'hydrogène ou des radicaux superoxydes, c'est-à-dire des ROS (Lu et al, 2008).

La stéatose étant asymptomatique, la consommation d'alcool à son origine peut être maintenue par le sujet et engendrer des atteintes aiguës d'hépatites qui se superposent aux lésions hépatiques déjà présentes. On retrouve ainsi à la fois des vésicules de triglycérides caractéristiques de la stéatose, ainsi que les atteintes d'hépatites tels que le ballonnement cellulaire, l'infiltration des neutrophiles ou encore l'agglomération de filaments intermédiaires. La SHA comme la stéatose est généralement asymptomatique et réversible.

1.4.3 Fibrose

Dans le cas de lésions hépatocytaires comme décrites précédemment, de nombreux médiateurs sont excrétés dans le milieu extracellulaire. Ces médiateurs peuvent être notamment des cytokines, des chemokines, des facteurs neuroendocriniens, des facteurs angiogéniques ou des composants du système immunitaire. Ces médiateurs activent entre autres les cellules étoilées du foie (CEF) (voir Figure 06). Ces cellules sont responsables de la majorité de la production de la matrice extracellulaire (MEC) à l'origine même du processus de cicatrisation appelée fibrose (Figure 07 et 08). Ce phénomène physiologique permet de limiter l'étendue du microenvironnement inflammatoire et donc isoler la lésion. Cependant une surproduction de MEC est à l'origine du développement d'une fibrose hépatique jusqu'à un stade pathologique irréversible (voir Figure 08).

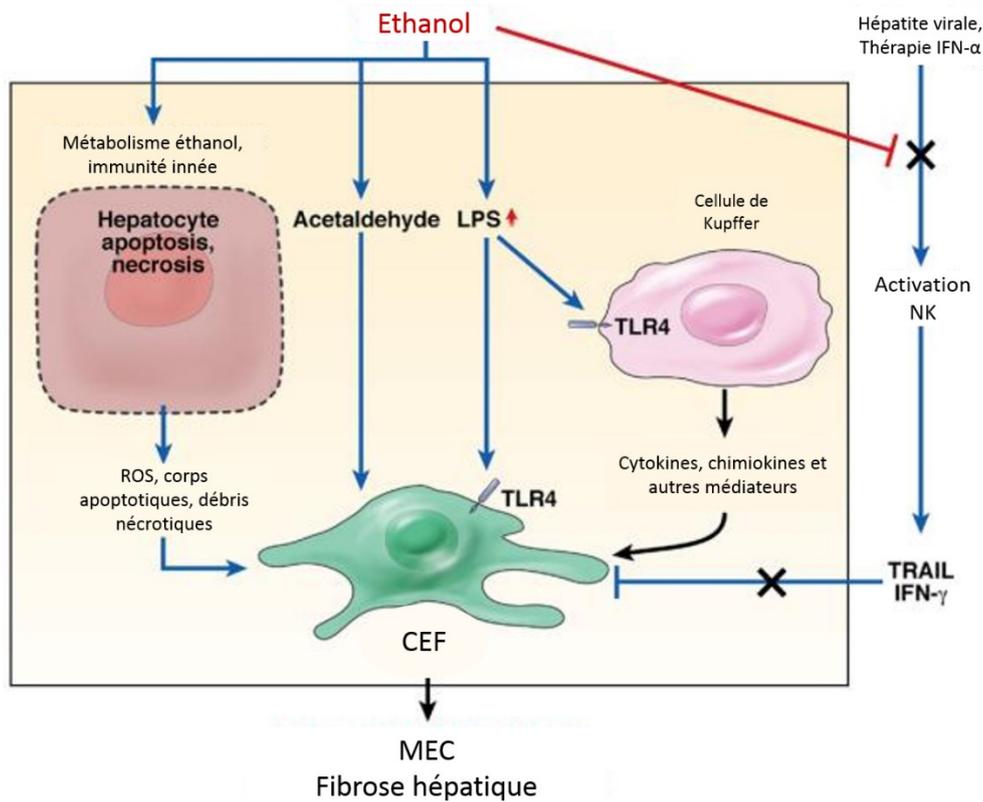


Figure 06 : Mécanismes directs et indirects impliqués dans l'activation par l'éthanol des CEF à l'origine de la fibrose hépatique, traduit de (Gao and Bataller, 2011). Le métabolisme de l'éthanol implique la production d'acétaldéhyde, de ROS et d'autres débris cellulaires et bactériens induisant une souffrance hépatocytaire, une activation des cellules immunitaires ainsi que celles des CEF qui produisent un tissu cicatriciel.

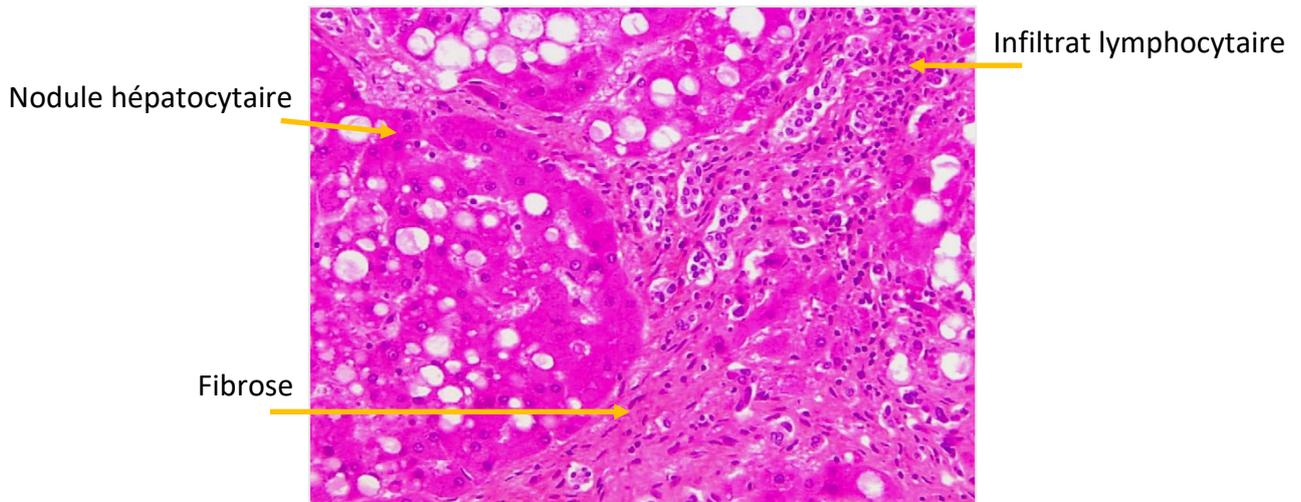


Figure 07 : Coupe histologique de foie atteint de fibrose. Coloration HES, courtoisie du Pr D. Chatelain (CHU Amiens-Picardie).

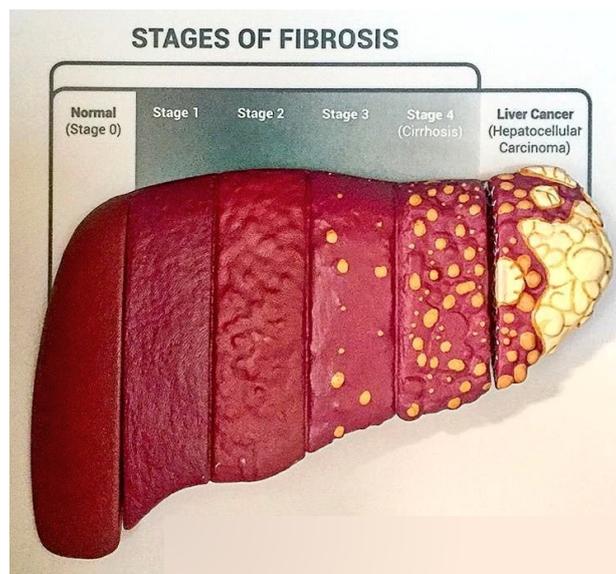


Figure 08 : Aspect macroscopique d'un foie fibrosé, allant du stade F0 (foie sain) jusqu'à la généralisation de l'atteinte retrouvée au stade F4 (cirrhose) puis le CHC.

L'activation des CEF lors de ce processus de fibrogenèse alcoolique implique différents acteurs (Figure 06) :

- l'hépatocyte en souffrance
- l'acétaldéhyde issu du métabolisme intestinal de l'éthanol
- les lipopolysaccharides (LPS) sanguin issu d'une augmentation de la perméabilité intestinale qui activera directement les CEF ou indirectement via l'activation au préalable des cellules de Kupffer
- l'inactivation des cellules Natural Killer

Lors de la progression de la MAF, notamment lors d'hépatites, les hépatocytes lésés par leur exposition à l'alcool produisent des corps apoptotiques, de la nécrose ainsi qu'un environnement inflammatoire. Cela provoque l'activation du système immunitaire, notamment des cellules de Kupffer, dont le rôle est de limiter l'étendue de la lésion. En parallèle, ces processus sont aussi à l'origine de l'activation des CEF qui produisent de la MEC pour remplacer le tissu en souffrance par un tissu cicatriciel non-fonctionnel.

L'accumulation de lésions hépatiques issues de la production de ROS, de l'établissement d'un environnement pro-inflammatoire ou des effets associés au métabolisme de l'éthanol et de l'acétaldéhyde entraînent une mortalité cellulaire. Afin de contenir cet environnement pro-inflammatoire et les dégâts secondaires à une nécrose focale, les CEF activées produisent un tissu fibreux afin de remplacer le tissu endommagé. Cependant la répétition de ce phénomène entraîne le remplacement progressif du tissu hépatique fonctionnel par un tissu cicatriciel non-fonctionnel, qui par ailleurs modifie la structure architecturale de l'organe. Cette réponse physiologique normale devient ainsi pathologique, on parle de fibrose. Dans les stades les plus avancés de fibrose, lorsque celle-ci s'est généralisée, on parle de cirrhose du foie.

1.4.4 Composante intestinale

Bien que le foie métabolise la majorité de l'alcool ingéré, d'autres systèmes participent également à cette métabolisation. C'est le cas du système intestinal.

Les quantités d'alcool métabolisées par l'intestin et le microbiote intestinal sont cependant minimales (Elamin et al., 2013), mais auront tout de même des implications au niveau de la perméabilité intestinale. Celle-ci est composée à la fois d'une barrière physique originaire des jonctions entre les entérocytes (jonctions serrées, jonctions adhérentes ou desmosomes), ainsi que d'un mucus épais composé de glycoprotéines contenant des peptides antimicrobiens induisant une inhibition ou destruction des agents bactériens afin de maintenir l'homéostasie (Leclercq et al, 2018).

Il a été mis en évidence qu'une consommation chronique d'alcool ainsi que la présence d'acétaldéhyde au niveau intestinal est à l'origine d'une perméabilité de la barrière intestinale (Chaudhry et al., 2015). Cette perméabilité intestinale est issue d'une réduction des jonctions serrées et de leur intégrité (Wang et al., 2014). Il a aussi été retrouvé un impact négatif de l'alcool sur la composition du mucus (Yan et al, 2011). De manière intéressante, les patients souffrant d'un TUA présentent un mucus plus épais au niveau de l'intestin grêle mais celui-ci est plus perméable que celui de la population générale (Hartmann et al, 2013).

Secondaire à cette perméabilité intestinale induite chez une partie des patients souffrant de TUA, une dysbiose intestinale peut aussi être retrouvée (Leclercq et al, 2014) (Yan et al., 2011). Cette dysbiose intestinale correspond à une dérégulation dans l'équilibre entre les bactéries protectrices et les bactéries délétères au niveau de la flore bactérienne commensale résidente.

Pris ensemble, cette perméabilité et cette dysbiose intestinale contribuent à la susceptibilité individuelle à la MAF) via la potentialisation de la translocation bactérienne vers la circulation portale (Llopis et al, 2016. Le LPS atteint ainsi le foie et active les cellules de Kupffer et les CEF via la fixation au toll like receptor 4 (TLR4) (Dhanda et al., 2012). Tous les alcoolos-dépendants n'ayant pas la même composition microbienne (Dubinkina et al., 2017), il est donc actuellement considéré que la dysbiose intestinale et la translocation bactérienne sont des co-facteurs nécessaires au développement de la MAF chez les sujets consommant chroniquement de l'alcool (Keshavarzian et al., 2009).

Dernièrement il s'agit aussi d'une stratégie thérapeutique en plein développement pour les formes d'hépatite alcoolique aiguë sévère inéligible au traitement (Philips et al., 2017).

L'alcool consommé a donc un double effet au niveau intestinal, tout d'abord celui d'altérer l'équilibre de la flore intestinale en favorisant une flore néfaste et en réduisant la flore protectrice. Ajouté à une hyperperméabilité intestinale induite par une consommation chronique d'alcool, cela potentialise la translocation des bactéries néfastes vers la circulation portale. Cette composante induit une sur-activation du système immunitaire, et donc un environnement inflammatoire et la fibrogenèse à l'origine même de la MAF.

1.4.4 Maladie chronique avancée du foie – Cirrhose

Il est estimé que 40% des personnes consommant quotidiennement plus de 50g d'éthanol depuis 5 ans présentent une forme sévère de fibrose ou une cirrhose (Naveau et al., 2005).

En 2016, 335 000 personnes seraient décédées d'une cirrhose d'origine alcoolique (IHME, 2018). Ce taux de mortalité élevé est dû à la fois à un développement pathologique paucisymptomatique et à l'utilisation de tests inadaptés quant à l'estimation de la sévérité de la cirrhose. Effectivement dans 15 à 20% des cas de cirrhose le *Model for End-stage Liver Disease* (MELD), test permettant d'estimer la gravité de la pathologie hépatique, ne permet pas une évaluation précise du taux de survie (Kamath et al., 2007). Le MELD est un système de notation initialement développé pour prédire la survie des patients ayant des complications portales, qui s'est avéré pertinent dans les cas des cirrhoses infectieuses, avec varices, ou encore lors d'insuffisances hépatiques aiguës comme lors d'hépatites alcooliques. Cependant le MELD ne prend pas en compte les facteurs nutritionnels, l'état physique, ni certains facteurs associés à la mortalité chez les patients cirrhotiques (sarcopénie, hyponatrémie, hypoalbuminémie, ...) (Kim et al., 2008; Myers et al., 2013, 2014; van Vugt et al., 2017) ce qui peut résulter en un pronostic vital optimiste quant à la survie de certains patients.

La cirrhose du foie est caractérisée par une atteinte fibreuse de l'ensemble du tissu hépatique (Fibrose classée F4, voir Figure 08) ce qui aboutit à une déformation architecturale des lobules hépatiques avec la formation anarchique de nodules de régénérations (voir Figure 09). Ces

derniers correspondent à des hépatocytes en régénération tentant de compenser la perte d'hépatocytes fonctionnels issue des phénomènes immuno-inflammatoires.

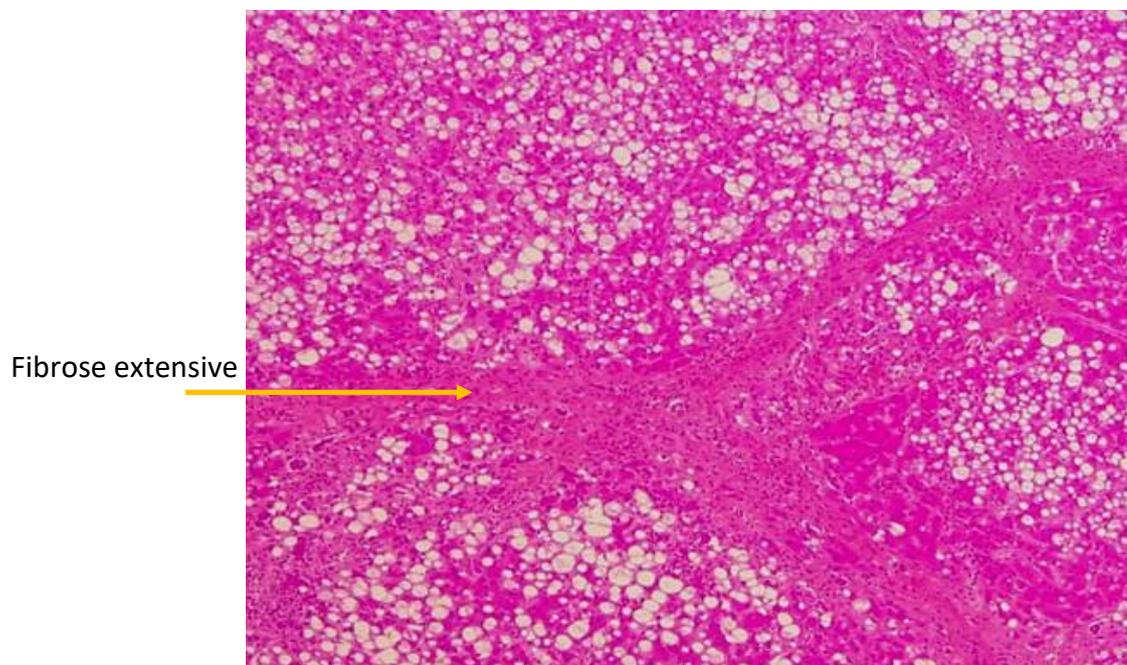


Figure 09 : Coupe histologique de foie atteint de cirrhose et stéatose. Coloration HES, courtoisie du Pr D. Chatelain (CHU Amiens-Picardie).

La cirrhose du foie peut se présenter dans une forme asymptomatique, dite compensée, où la fonction hépatique est maintenue. Il s'agit de la forme de cirrhose avec le meilleur pronostic vital et une survie médiane supérieure à 12 ans (D'Amico et al., 1986, 2006). Au contraire la cirrhose décompensée présente une médiane de survie d'environ 2 ans. Un tableau clinique bruyant permet son diagnostic :

- Un syndrome de cytolysse, correspondant à la perméabilisation des membranes hépatocytaires et d'atteintes nécrotiques ce qui provoque un relargage du contenu cellulaire dans les capillaires.
- Un syndrome de cholestase, caractérisé par une atteinte de l'excrétion biliaire. Elle peut être issue d'une obstruction des voies biliaires ou résulter d'une atteinte du pôle biliaire des hépatocytes. L'excrétion n'étant plus réalisée de manière optimale, la bile

s'accumule au niveau hépatique avant d'atteindre le compartiment sanguin. Cela entraîne notamment une augmentation de la bilirubine sanguine, à l'origine même du phénomène d'ictère (jaunisse).

- Un syndrome d'insuffisance hépatocellulaire, c'est-à-dire une atteinte des principales fonctions du foie (digestion, stockage, détoxification, synthèse hormonale et protéique) principalement due à la désorganisation structurelle de l'organe et du remplacement progressif des cellules fonctionnelles par un tissu fibreux.
- Un syndrome mésenchymateux secondaire à la réduction de la perfusion sanguine hépatique ainsi que des fonctions des cellules de Kupffer qui produisent en quantité importante des immunoglobulines (IgA en particulier dans le cas de la MAF) dirigés contre les nombreux antigènes non ou mal détruits par les cellules de Kupffer.

En sus, on retrouve régulièrement une hypertension portale dans le cadre d'une MAF (Bolognesi et al., 2014), qui peut elle-même induire des varices oesogastriques (œsophage, estomac et rectum) ou un syndrome hépatorénal accentuant l'accumulation de liquides au niveau abdominal (ascite). Ces mêmes symptômes pouvant empirer la symptomatologie du patient, avec par exemple une hémorragie suite à la rupture de varice ou encore un sepsis issu d'une infection bactérienne du liquide d'ascite. Ils sont notamment utilisés par D'Amico et ses collaborateurs (D'Amico et al., 2006) pour proposer une classification en 4 stades de la cirrhose afin d'évaluer la mortalité à 1 an :

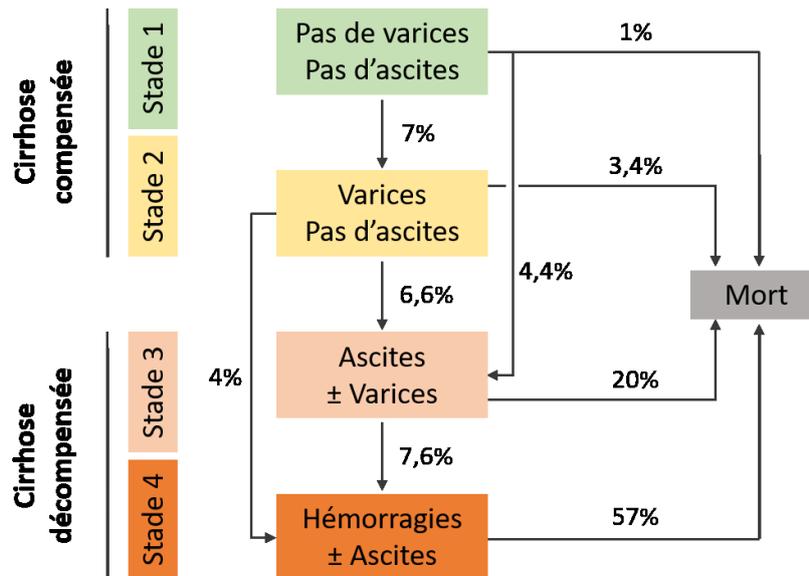


Figure 10 : Risque annuel de complications et de mortalité en fonction du stade de la cirrhose et l'évolution de la pathologie (Adapté de D'Amico et al., 2006).

Cependant, les 2 facteurs indépendamment associés à la mortalité dans le cadre du suivi de la cirrhose du foie sur 15 ans sont l'âge et le maintien de la consommation d'alcool (risque relatif de 2,9) (Bell et al., 2004).

L'environnement inflammatoire issu de la métabolisation de l'alcool, de l'effet de ses métabolites ou encore de la translocation bactérienne intestinale est à l'origine d'une résistance hémodynamique intrahépatique qui contribue à une défaillance multi-organes et une surmortalité (Mehta et al., 2015). Il a notamment été démontré qu'une consommation d'alcool de 0,5g/kg chez des patients cirrhotiques entraînait une détérioration significative du flux sanguin dans les veines azygos et hépatique en 15 minutes, et qui était maintenu pendant au moins 30 minutes (Luca et al., 1997).

Comme les signes cliniques de MAF décrits précédemment, la cirrhose hépatique peut être asymptomatique, ce qui correspond à sa forme avec le meilleur pronostic vital. Cependant lors de décompensation d'une cirrhose, la surmortalité induite est élevée. Celle-ci s'explique par une détérioration de l'état global du patient. Dans ce cas-ci, on observe une insuffisance

hépatique mais aussi une atteinte étendue au reste de l'organisme avec de l'hypertension, des varices, la production d'ascite, et les complications qui les accompagnent.

1.4.5 Le Carcinome Hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le cancer primitif du foie le plus fréquent (CIRC, 2014; Laursen, 2014). En termes d'incidence le CHC est le 7^{ème} cancer au monde (9,5 cas par 100 000 habitants) et le 3^{ème} en termes de mortalité (810 000 décès annuels) (Bray et al., 2018) (Ferlay et al., 2015). En France plus particulièrement, le CHC est diagnostiqué chez 10 620 personnes chaque année et cause la mort de 10 070 personnes (Ferlay et al., 2018).

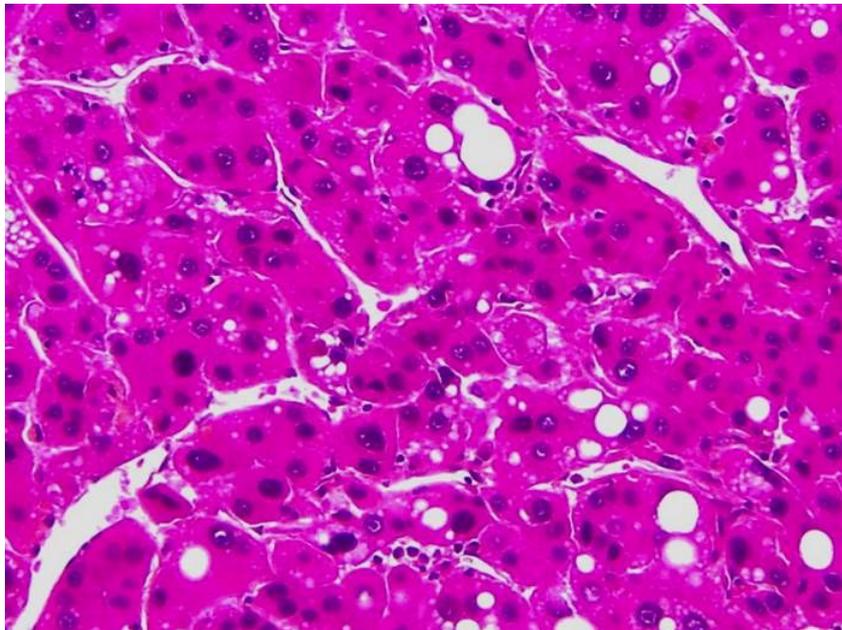


Figure 11 : *Coupe histologique de foie atteint de CHC. Coloration HES, courtoisie du Pr D. Chatelain (CHU Amiens-Picardie).*

Il se développe dans plus de 85% des cas à partir d'une cirrhose (Lata, 2010). Plus rarement il peut se développer sur une autre forme d'hépatopathie chronique non-cirrotique, et de manière inhabituelle sur foie sain (Blanc et al., 2017). Le CHC présente donc divers étiologies en fonction de l'étiologie de l'hépatopathie originelle. En Europe on peut considérer 3

étiologies majoritaires du CHC : l'origine virale (VHC et VHB), l'origine métabolique (obésité, diabète) et l'alcool.

L'éthanol est classé cancérigène pour l'Homme de groupe 1 par le Centre International de Recherche sur le Cancer depuis 1988 (CIRC, 1988). D'après une étude récente, 23% des hommes et 18% des femmes diagnostiqués d'un cancer présentent un mésusage de l'alcool selon le score AUDIT-C (Bosque-Prous et al., 2018). Après l'établissement du diagnostic de cancer, les patients maintenant une consommation d'alcool ont un risque de mortalité supérieur à ceux qui s'abstiennent (Araújo et al., 2013; Huang et al., 2014; Palli et al., 2000). Or, le maintien d'une consommation d'alcool est aussi associé à un risque accru de développer un second cancer primitif (Day et al., 1994; Druetne-Pecollo et al., 2014). En Europe, 60 à 80% des CHC se développent par-dessus une MAF, ce qui correspond à l'étiologie la plus sévère du CHC comparativement aux formes virales ou métaboliques (Marot et al., 2017). La consommation de boissons alcoolisées est associée à une augmentation significative du risque de cancer du foie de 10 % par 10 g d'éthanol consommé par jour (WCRF/AICR, 2007). Malgré ces résultats incriminants, il n'y a à l'heure actuelle en France aucune directive de santé publique prônant la réduction si ce n'est l'abstinence à l'alcool chez les patients atteints de cancer.

Le CHC est généralement suspecté après la découverte de lésion focale nodulaire hépatique lors d'un examen échographique. En premier lieu des tests non-invasifs peuvent être réalisés. Le biomarqueur de référence dans la surveillance du CHC à l'heure actuelle est l' α -fétoprotéine (AFP) sérique. C'est le seul marqueur à avoir passé les 5 phases de développement de biomarqueur pour cette utilisation (Sengupta and Parikh, 2017). Néanmoins ce marqueur de suivi a une utilisation très contestée dans le cadre du diagnostic, avec notamment de nombreux débats sur le seuil de détection à utiliser. Effectivement, si le seuil de 20 ng/mL semble celui présentant le meilleur équilibre entre sensibilité et spécificité selon une analyse ROC (*receiver operating curve*), cela correspond à une sensibilité de seulement 60% (c'est-à-dire que 40% des cas de CHC ne seront pas repérés) et une valeur prédictive positive (VPP) de 41,5% (c'est-à-dire que près de 60% des résultats sont des faux-positifs) (Barletta et al., 2005; Bruix et al., 2005; Trevisani et al., 2001). L'utilisation de seuils plus élevés réduit fortement la sensibilité mais permet l'obtention d'une forte spécificité, ainsi

des niveaux supérieurs à 400-500ng/mL sont considérés comme indicatifs d'un diagnostic de CHC (Bialecki and Di Bisceglie, 2005). D'après une étude récente menée dans un centre de transplantation californien, près d'un tiers des patients (31,3%) recevant une greffe de foie pour cause de CHC avancé n'ont pas ou peu d'AFP sérique ($\leq 10\text{ng/mL}$) (Agopian et al., 2017) tandis que l'on estime à 40-50% le taux de CHC ne produisant pas d'AFP (Sengupta and Parikh, 2017).

Il n'est donc pas recommandé d'utiliser l'AFP seul comme indicateur diagnostique de CHC. L'imagerie est donc l'option non-invasive à préférer afin de repérer de potentiels nodules. Les récentes recommandations américaines publiées par l'*American Association for the Study of Liver Disease* (AASLD) proposent ainsi d'utiliser l'algorithme LI-RADS (*Liver Imaging Reporting and Data System*) qui permet une standardisation dans l'estimation de la malignité d'un nodule repéré par imagerie (Marrero et al., 2018) (voir Figure 12). Cet algorithme permet la classification en 5 catégories du nodule observé, allant de la catégorie LI-RADS 1 qui correspond aux nodules certainement bénins, à la catégorie LI-RADS 5 correspondant aux CHC certains. A noter que cet algorithme décisionnel n'a pas encore été validé en prospectif.

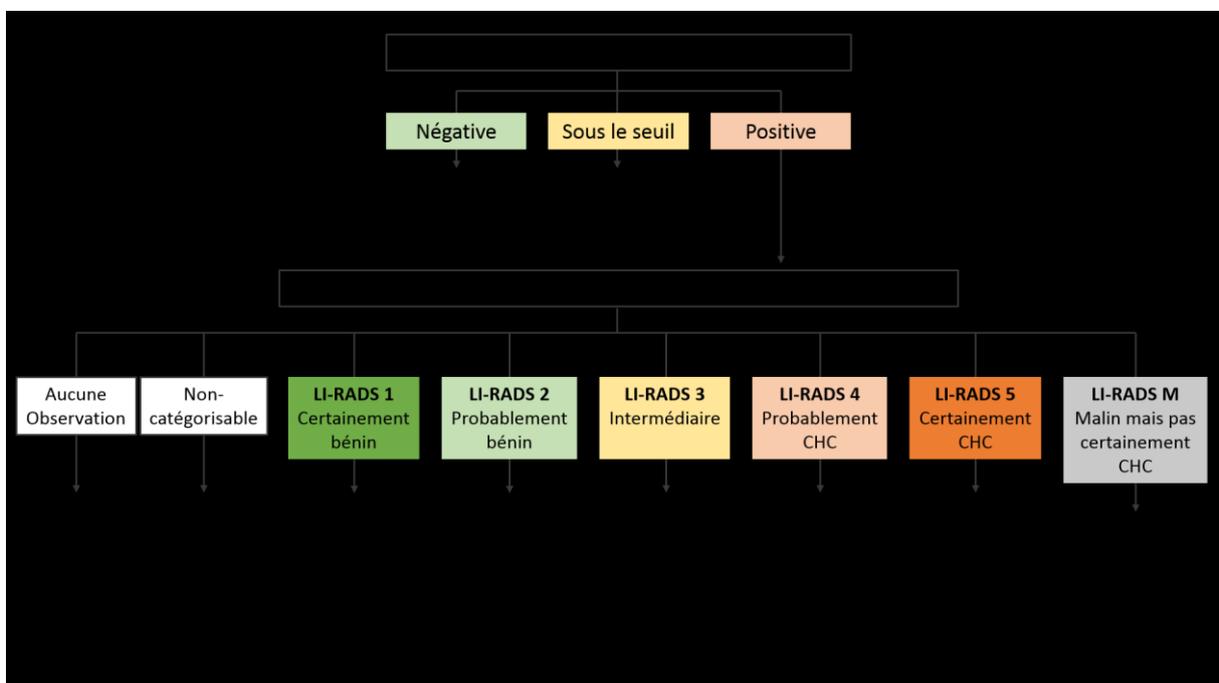


Figure 12 : Algorithme décisionnel de surveillance et de diagnostic du CHC par l'AASLD (Marrero et al., 2018)

En termes d'imagerie, les 2 examens de référence sont l'IRM et le scanner hélicoïdal, avec une légère supériorité pour la sensibilité de l'IRM à détecter et caractériser les nodules, ainsi qu'à distinguer les nodules de régénération et les nodules cancéreux (Colli et al., 2006). Cependant il est à noter que le diagnostic de nodules dont le diamètre est inférieur à 1cm reste difficile par imagerie due à la faible sensibilité de ces méthodologies (Lee et al., 2015) et le diagnostic affirmé dans environ 30% des cas (Trinchet et al., 2011).

Outre les techniques non-invasives, l'unique méthodologie pour l'obtention d'un diagnostic de certitude de CHC est la ponction-biopsie hépatique (PBH). D'ailleurs, l'étude de Compagnon et collaborateurs met en évidence que 20% des transplantations hépatiques sans PBH pré-opérative en France sont réalisées sans atteinte tumorale (Compagnon et al., 2008). L'intérêt de la PBH est multiple : elle permet de poser un diagnostic de certitude, mais aussi de caractériser la tumeur ce qui permet une évaluation pronostic et une potentielle prise en charge personnalisée.

Néanmoins, la biopsie n'est pas un test de dépistage parfait. La sensibilité d'une première PBH est de 70% tandis que la sensibilité de la seconde biopsie est de 61,1% (Forner et al., 2008). De plus la PBH n'est pas réalisable pour tous les patients suspectés d'être atteints de CHC. En effet, de par la nature même du CHC qui se développe à 85% sur un foie non-sain (Lata, 2010), le risque de complications hémorragiques n'est pas anodin. D'autre part, parmi les contre-indications à la PBH se trouve aussi la présence d'ascite, c'est-à-dire l'accumulation de liquide potentiellement infecté au niveau abdominal qui pourrait être à l'origine d'un sepsis.

Au cours de l'année 2018 de nombreuses recommandations (américaines, européennes ou françaises) ont été publiées et toutes s'accordent sur l'utilisation de la classification BCLC (*Barcelona Clinic Liver Cancer*) afin de standardiser et améliorer la prise décisionnel concernant le choix thérapeutique (Blanc et al., 2017; Marrero et al., 2018; Thursz et al., 2018) (voir Figure 13).

La classification BCLC permet d'opter pour un traitement curatif, palliatif ou de soutien symptomatique en fonction de la fonction hépatique (critère Child-Pugh), de l'état de santé général (score OMS) et les caractéristiques des nodules (nombre, taille et infiltration).

Le dépistage du CHC permet la découverte de nodules à un stade précoce et donc le recours à des traitements curatifs. Ainsi, 77% des cas dépistés au stade précoce profitent de tels traitements, ce qui explique un taux de survie à 5 ans de 50 à 80%. Toutefois ces stades précoces ne représentent que 30 à 40% des cas retrouvés en clinique.

Du fait de l'absence de symptômes cliniques évidents, le diagnostic se fait majoritairement (50-60% des cas) à un stade intermédiaire ou avancé, ce qui exclue *de facto* les options curatives. Dans ces cas le pronostic vital à 5 ans est réduit, avec respectivement une médiane de survie à 16 et 11 mois (Llovet et al., 2008; Zhang et al., 2018a).

Enfin, lorsque l'état général du patient s'avère dégradé (OMS>2) et les fonctions hépatiques réduites (Child-Pugh C), l'unique option thérapeutique est un traitement de soutien afin de réduire la symptomatologie et d'accompagner le patient.

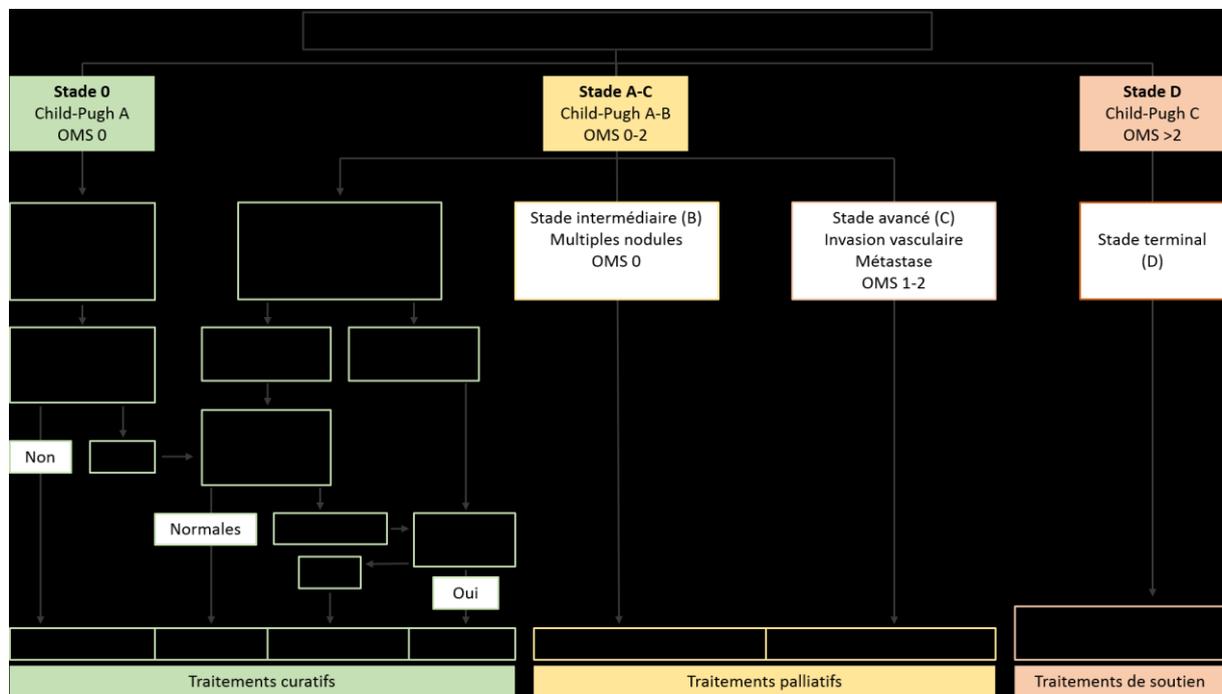


Figure 13 : Algorithme décisionnel de la Barcelona Clinic Liver Cancer concernant la prise en charge thérapeutique du CHC (Adapté de Llovet et al., 1999).

Ainsi les traitements curatifs reposent sur 3 méthodologies :

L'ablation percutanée consiste à insérer une aiguille au niveau de la tumeur pour la soumettre à une injection d'alcool ou plus récemment de radiofréquences (Cho et al., 2009), induisant ainsi une nécrose sur un rayon de 2,5cm autour du point d'injection. Cette technique, réservée aux CHC très précoces ou de stade A, est une alternative à la chirurgie généralement très bien supportée, avec notamment moins de complications majeures (Blanc et al., 2017). Les patients soumis à ce protocole présentent un taux de survie à 5 ans de 70% (Livraghi et al., 2008). L'atteinte tumorale ne doit cependant pas se trouver à proximité du hile ou des gros vaisseaux et voies biliaires.

La résection tumorale est idéalement réalisée chez les patients atteints d'un nodule unique de moins de 5cm de diamètre, sans cirrhose sous-jacente ou alors compensée (Child-Pugh A) (Forner et al., 2018). Dans ce cas le taux de survie à 5 ans est de 68% avec une mortalité post-opératoire de 1% (Belghiti et al., 2000; Ishizawa et al., 2008; Lim et al., 2012). Dans les cas où la fonction hépatique est plus détériorée (Child-Pugh B), l'abord laparoscopique permet d'étendre les indications de la résection lorsque les tumeurs sont superficielles. Dans ce cas-ci, le taux de survie n'est plus que de 58% et la mortalité post-opératoire de 45% (Ishizawa et al., 2008). En principe le volume hépatique restant doit correspondre à au moins 40% du volume originel.

La transplantation hépatique n'est indiquée que dans un contexte de CHC avec une cirrhose sous-jacente, elle a le double avantage de traiter la tumeur et sa cause. Théoriquement elle est proposée aux patients entrant dans les critères de Milan (Mazzaferro et al., 1996), c'est-à-dire une masse focalisée de 2 à 5cm de diamètre ou jusqu'à 3 nodules ne dépassant pas 3cm de diamètre, avec une absence de thrombose portale et hépatique. La greffe pour CHC a la même efficacité que celle pour cirrhose, soit la guérison de 66% des patients (Bruix et al., 2005). Le taux de survie à 5 ans est de 63 à 80% (Mazzaferro et al., 2011) avec un taux de récurrence réduit (4 à 20%) (Blanc et al., 2017). En France comme aux USA, le CHC représente 30% des transplantations hépatiques (Kim et al., 2016).

Tandis que les traitements palliatifs correspondent à :

La chimioembolisation est le traitement palliatif de première intention pour les CHC évolués, généralement multinodulaires, en absence d'atteintes du flux portal et de métastases, avec une fonction hépatique plutôt conservée (Child-Pugh A ou B7) et un bon état général (OMS 0). Ce traitement correspond à une injection au niveau de l'artère hépatique – en passant par un cathéter – d'une chimiothérapie et d'agents d'embolisation. Cette option thérapeutique, généralement réalisée 3-4 fois sur une période d'une année, améliore la survie globale à 48,6 mois (comparé aux 16 mois sans traitement). Cependant on note un taux de récurrence du CHC de 72% dans les 9 mois suivant le début du traitement. L'occurrence de telles récurrences est une contre-indication à la chimioembolisation, l'unique option thérapeutique pour ces patients est la thérapie ciblée. L'utilisation de la chimioembolisation dans les étiologies alcooliques du CHC reste controversée suite à plusieurs études démontrant une absence de gain (Doffoël et al., 2008).

La thérapie ciblée est un traitement médicamenteux qui cible spécifiquement des voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse hépatique. Cette stratégie thérapeutique a été développée due à la résistance du CHC aux chimiothérapies conventionnelles (Thomas et al., 2008). Le **Sorafenib** (Nexavar[®]) est la première molécule à avoir démontré un intérêt significatif en allongeant à la fois la survie (10,7 contre 7,9 mois) et la survie sans progression (5,5 contre 2,8 mois) (Llovet et al., 2008). Il s'agit désormais du traitement de routine pour les patients avec un CHC de stade BCLC C, une fonction hépatique conservée (Child-Pugh A) et un état général satisfaisant (OMS 0-2), bien qu'en pratique son utilisation est élargie, notamment à des fonctions hépatiques potentiellement moins conservées. Plus récemment le **Lenvatinib** (Lenvima[®]) a démontré dans un essai de non-infériorité au Sorafenib une efficacité lui valant d'être le 2nd traitement de première intention (bientôt validé par l'agence européenne du médicament) pour les grades de BCLC B ou C. Dans cette étude, la survie globale était de 13,6 mois sous Lenvatinib et 12,3 mois sous Sorafenib, tandis que la survie sans progression était significativement améliorée avec le Lenvatinib (respectivement de 7,4 et

3,6 mois) tout comme le taux de réponse objective (24% contre 9%, respectivement) (Kudo et al., 2018). En cas d'échec à ces thérapies, un traitement de 2nd intention peut être envisagé suite à l'échec ou l'intolérance des traitements de 1^{ère} intention. Dans ce cadre-ci le **Regorafenib** (Stirvaga®) a reçu en 2017 une AMM suite à un essai de phase III positif : survie globale de 10,6 mois contre 7,8 mois sous placebo (Bruix et al., 2017), mais seuls 21,6% des patients non-répondeurs au Sorafenib seraient éligibles au Regorafenib (Longo et al., 2018). Aux Etats-Unis le **Cabozantinib** (Cabometyx®) a reçu en 2018 une AMM comme traitement de 2nde ligne après avoir montré un intérêt sur la survie globale de 10,2 mois contre 8,0 sous placebo (Abou-Alfa et al., 2018). Parmi les traitements de 2nde ligne l'immunothérapie a récemment produit le **Nivolumab** (Opdivo®) qui a reçu une autorisation accélérée aux Etats-Unis notamment grâce à son taux de réponse objectif presque 3 fois supérieur au Regorafenib (20% contre 7%) et une médiane de survie non atteinte (>13mois) avec un taux de survie >75% à 9mois (El-Khoueiry et al., 2017). Enfin, dans une refonte de l'essai REACH, le **Ramucirumab** semble montrer une augmentation de la médiane de survie à 7,8 mois contre 4,2 mois sous placebo pour les patients en échec sous Sorafenib et avec un taux d'AFP >400 ng/mL (Zhu et al., 2015).

Le CHC est une forme sévère de maladie chronique du foie qui se développe en général sur une cirrhose sous-jacente. Son étiologie est donc dépendante de celle de la pathologie hépatique chronique sur laquelle la masse tumorale se développe. Or l'étiologie du CHC semble un élément clé dans son évolution puisqu'il a été observé qu'un CHC d'origine alcoolique avait un taux de progression plus rapide que les autres étiologies (virale ou métabolique), que les patients étaient plus jeunes et le pronostic péjoratif. Cela a notamment un impact sur la fonction hépatique lorsque le diagnostic est posé, et sur les stratégies thérapeutiques envisageables. Effectivement, plusieurs traitements curatifs sont réalisables dans les stades précoces du CHC, mais la majorité des cas sont diagnostiqués trop tardivement. Or le taux de réussite thérapeutique des cas intermédiaires/avancés de CHC est grandement réduit malgré les nouvelles thérapies pharmacologiques disponibles. Ce constat illustre la nécessité de développer de nouveaux biomarqueurs du suivi de la maladie chronique du foie afin d'augmenter le nombre de patients ayant accès à la thérapie curative.

2. Les micro-ARNs (miARNs)

2.1 Définition

Initialement découverts en 1993 chez une espèce de nématode, le *Caenorhabditis elegans*, les micro-ARNs (miARNs ou miRs) sont des petits ARNs non-codants de 19 à 24 nucléotides de longueurs (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Leur intérêt réside dans la description initiale de Wightman qui a observé un rôle de *lin-4* – le premier miRNA identifié – dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène *lin-14*.

Depuis cette première observation, on sait désormais qu'un unique miARN ne régule non pas un gène ou une voie de signalisation, mais potentiellement plusieurs centaines (exemple en Figure 14) (He et al., 2017; Thomson et al., 2011). On estime ainsi que 60% du génome des mammifères est régulé par les miARNs (Hafner et al., 2012).

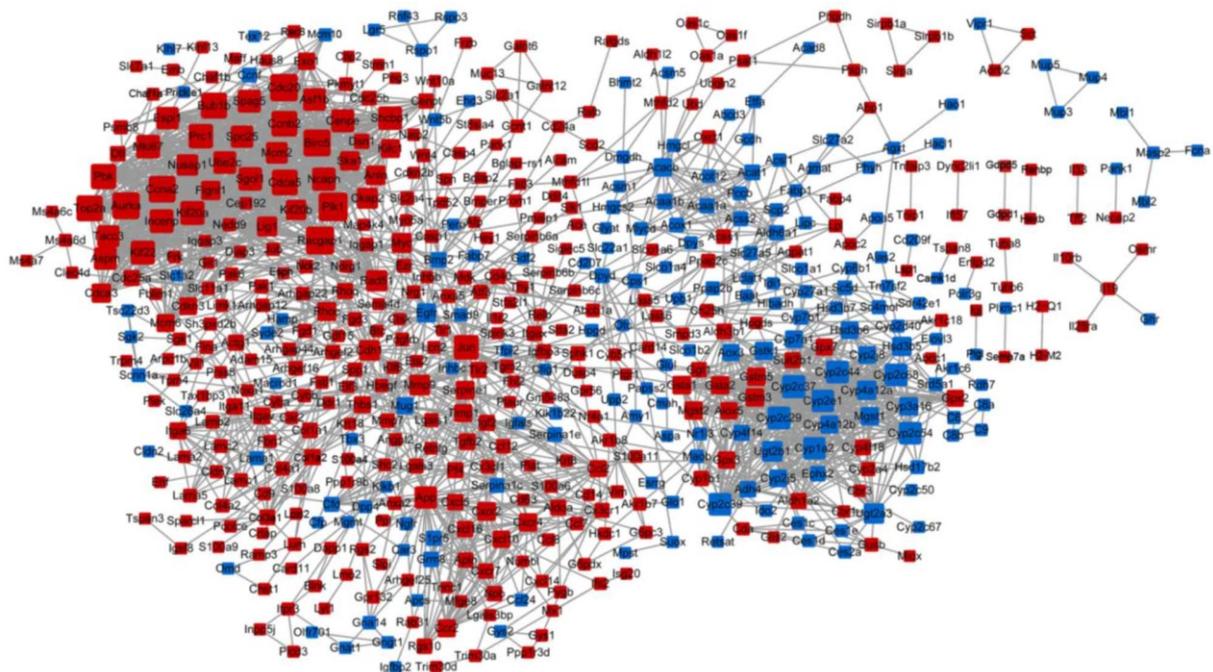


Figure 14 : Réseau protéique régulé par le miR-122 chez des souris KO comparé à des souris normales. 713 gènes sont sur-exprimés (rouge) tandis que 395 sont sous-exprimés (bleu). Issu de (He et al., 2017).

Suite à ces études de nombreux miARNs ont été découverts, en particulier chez les mammifères et l'Homme. D'après la miRbase (www.mirbase.org), une banque de données mise au point en 2006 pour recenser les miARNs (Griffiths-Jones et al., 2006), plus de 2 600 miARNs différents ont été à ce jour identifiés chez l'Homme.

2.2 Nomenclature

Le premier élément de nomenclature des miARNs informe sur l'espèce d'origine (Griffiths-Jones et al., 2006). Il s'agit d'un préfixe de 3 à 4 lettres, comme on peut voir pour le **hsa-miR-34a** où hsa est une abréviation d'*homo sapiens*. La deuxième partie indique s'il s'agit d'un miARN mature (miR) ou de son précurseur ou gène (mir). S'en suit un numéro indiquant l'ordre de découverte du miARN original.

Afin d'identifier plus facilement les miARNs et potentiellement leurs fonctions, ceux-ci ont été regroupés en familles. Chaque membre d'une même famille de miARN possède en commun la séquence entre le 2^{ème} et le 8^{ème} nucléotide (la séquence *seed*) (Bofill-De Ros et al., 2019). Les membres d'une même famille de miARN dérivent généralement d'un même miR commun et ont donc une fonction physiologique proche (Zou et al., 2014). Ainsi, l'on distingue chaque membre d'une famille à l'aide d'une lettre derrière son numéro. Par exemple, la famille miR-34 possède 3 membres : hsa-miR-34a/b/c. De plus, depuis leur découverte, il a été démontré une homologie entre cette famille et celle des miR-449, d'où la création de superfamilles – ici la superfamille miR-34/449.

Si plusieurs formes matures d'un même miR existent avec des *loci* différents, on les identifie en ajoutant un numéro en plus : hsa-miR-125b-1 et hsa-miR-125b-2 par exemple.

Enfin, comme nous le verrons lors de la biogénèse des miARNs, celle-ci génère 2 séquences simples brins de miARNs matures : une séquence en 5' de la structure en épingle et une séquence en 3' (Yang et al., 2011). La nouvelle nomenclature précise cette origine dans le nom de chaque miR : hsa-miR-34a-3p ou hsa-miR-34a-5p. Cette dernière information est une mise à jour de l'ancien système de nomenclature qui ne précisait pas la position de la séquence mais considérait l'existence d'un miARN actif majoritaire (hsa-miR-34a) et de son miARN complémentaire généralement dégradé (hsa-miR-34a*). Or certains miR* s'accumulent à des niveaux non-négligeables *in vivo* (Okamura et al., 2008) et ne sont pas

forcément exclus des complexes fonctionnels comme assumé précédemment (Okamura et al., 2008; Ruby et al., 2007). Cette ancienne nomenclature ne se basait donc pas sur une information invariable comme la position de la séquence codante, mais sur la fonctionnalité du miARN, ce qui rendait difficile la communication, notamment pour les études translationnelles. Cependant la fonctionnalité d'un miARN étant une information importante, l'ancienne nomenclature est encore largement utilisée.

Durant ce travail de thèse les miARNs seront identifiés sans précisions de l'espèce étudiée. En effet, la conservation synténique inter-espèce permet une homologie des miARNs étudiés entre la version murine et la version humaine. De même, afin de faciliter la compréhension la nomenclature de fonctionnalité sera préférée à celle de positionnement sur le brin : on parlera ainsi de miR-126* et non du hsa-miR-126-5p.

2.3 Biogénèse du miARN

2.3.1 miARNs primaires

Le niveau d'expression des miARNs est fortement associé à l'expression de gènes (codant ou non) présents dans la même région génomique (Rodriguez et al., 2004). En effet, les gènes des miARNs sont retrouvés à parts équivalentes dans des unités introniques de gènes codants et dans des régions non-codantes pour des protéines. Ainsi les miARNs primaires (pri-miARN) peuvent être transcrits après épissage alternatif d'ARN messenger ou via un promoteur indépendant permettant le recrutement de l'ARN polymérase II (ARN pol II) (Lee et al., 2004) ou l'ARN pol III (Borchert et al., 2006). Environ un tiers des gènes de miARNs sont regroupés en zone très restreintes, appelées *clusters*, et sont ainsi transcrits en un seul et même pri-miARN polycistronique avant d'être clivés (Lee et al., 2002).

Les pri-miARNs sont des ARNs double-brins de quelques kilobases (kb) avec une structure en épingle (voir Figure 15), c'est-à-dire une tige d'environ 33 paires de bases (pb) et d'une boucle terminale reliant les 2 brins. On retrouve aussi de l'ARN simple brin à l'extrémité terminale du pri-miARN.

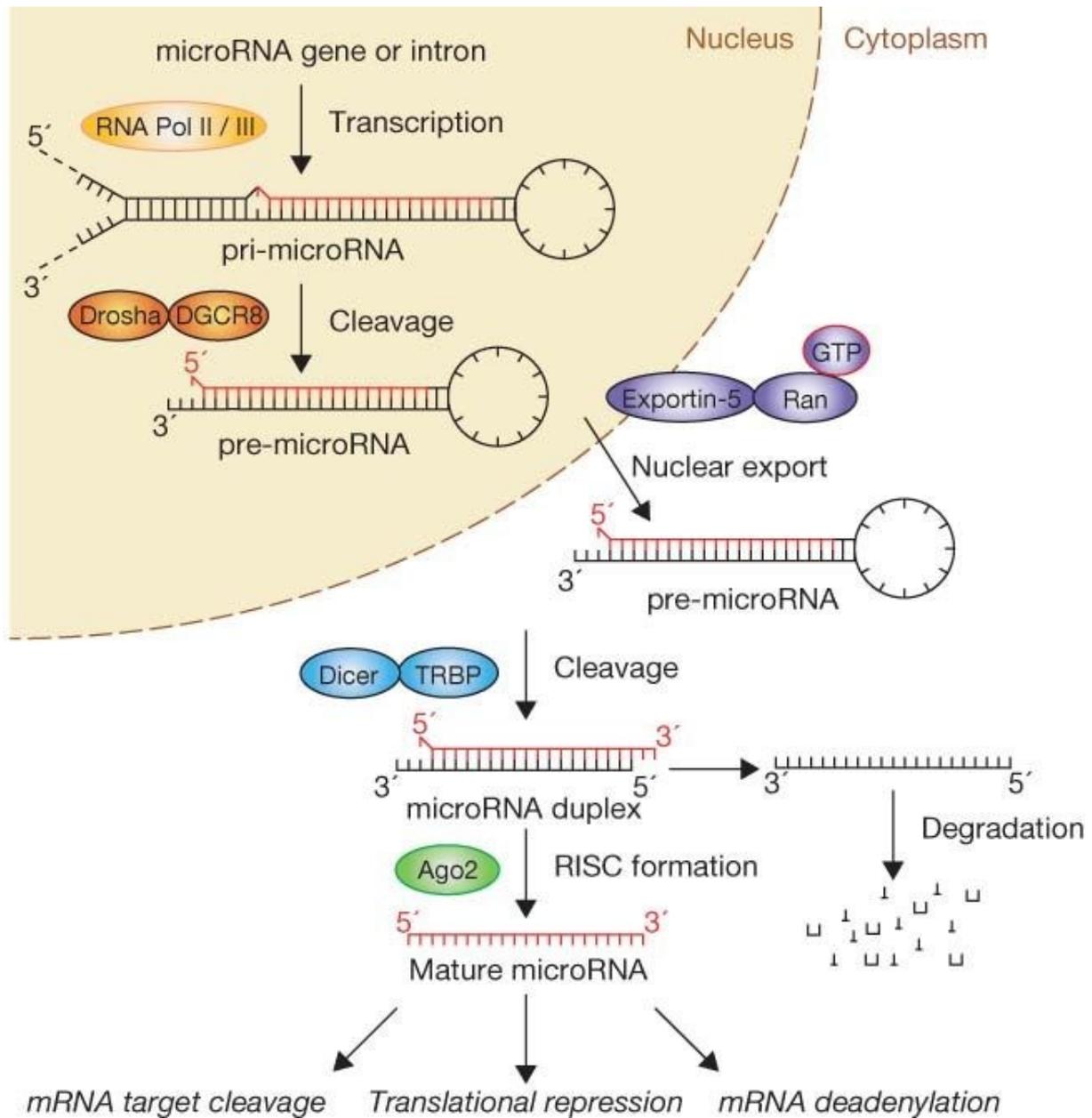


Figure 15 : Biogénèse des miARNs. La synthèse de miARNs commence par la transcription de pri-miARN par l'ARN polymérase II ou III. S'en suit un clivage à l'origine du pré-miARN qui est exporté en dehors du noyau avant d'être à nouveau clivé et séparé en 2 brins de miARNs matures. Issue de (Winter et al., 2009).

Les pri-miR sont des ARN double-brin issus de la transcription de gènes codants et éliminés par épissage alternatif, ou alors transcrit grâce à un promoteur spécifique. Ils sont uniquement retrouvés dans le noyau cellulaire et présentent une structure en épingle de quelques kb de longueur.

2.3.2 miARNs précurseurs

Le pri-miARN précédemment décrit sera ensuite clivé afin d'obtenir un miARN précurseur (pré-miARN) (voir Figure 15). Cette étape est réalisée de manière co-transcriptionnelle, que le gène codant le miARN soit d'origine intronique ou exonique (Morlando et al., 2008).

Ce clivage est réalisé par un complexe protéique appelé microprocesseur nucléaire (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004). Il s'agit de la combinaison d'une RNase de type III, la Drosha, et d'une protéine possédant des domaines de fixation à l'ARN double brin, la *DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8* (DGCR8) – aussi appelé Pasha chez la Drosophile. Ainsi la DGCR8 permet la fixation du complexe protéique au niveau de la jonction entre l'ARN double-brin et l'ARN simple-brin du pri-miARN et le positionnement de Drosha au niveau du site de clivage qui sera à l'origine de l'extrémité 5p et 3p des futurs miARNs matures (Han et al., 2006; Lee et al., 2003).

Le pré-miARN obtenu, de 60 à 70 nucléotides de long, est ensuite exporté du noyau par l'exportin-5 dépendante d'une protéine *Ras-related Nuclear couplée au GTP* (Ran-GTP). La fixation du pré-miARN à ce complexe va d'abord lui permettre une protection contre la dégradation par des nucléases dans le noyau, avant que ce complexe traverse la paroi nucléaire via les pores nucléaires (Bohnsack et al., 2004; Yi et al., 2003; Zeng and Cullen, 2004). Une fois le cytoplasme atteint, l'hydrolyse du GTP en GDP permet la dissociation du complexe pré-miARN/exportin-5/Ran-GTP.

Les pré-miR sont obtenus à partir des pri-miR après clivage par le microprocesseur nucléaire. Ce clivage, qui peut être réalisé de manière concomitante avec la transcription du gène, permet l'obtention d'un ARN double brin de 60-70 nucléotides de longueur qui pourra être exporté en dehors du noyau par l'exportin-5 couplé au Ran-GTP.

2.3.3 Maturation cytoplasmique

Une fois dans le cytoplasme, la fixation du complexe RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) *Loading Complex* (RLC) va permettre le dernier clivage. Ce complexe RLC est notamment

composé d'une nouvelle RNase de type III appelée Dicer ainsi que d'une protéine de liaison à l'ARN double brin : TRBP (*transactivation-responsive RNA-binding protein*) (MacRae et al., 2008).

L'action de Dicer va ainsi permettre l'obtention d'un ARN double brin de 19 à 24 nucléotides, qui est à l'origine du miARN mature. Comme évoqué dans la nomenclature (revoir section 2.2), cet ARN double brin permet l'obtention d'un miARN 5' et d'un miARN 3'. On a longtemps pensé qu'un seul miARN résultait de ce processus, c'est-à-dire qu'un brin était fonctionnel après sa fixation à la protéine argonaute Ago2, tandis que le second – le miARN* – était dégradé de par son manque d'affinité pour Ago2. Bien qu'en quantité généralement plus faible, les miARNs* ont tout de même une activité physiologique et peuvent se fixer à Ago2 pour former un complexe RISC (Yang et al., 2011).

Une fois dans le cytoplasme, le pré-miR va à nouveau être clivé par Dicer afin d'obtenir un ARN double brin de 19-24 nucléotide qui donnera les 2 brins (5p et 3p) du miARN mature.

2.4 Fonctionnement des miARNs

Une fois mature, un miARN se combine avec une protéine argonaute pour former le complexe RISC. En effet, le miARN ne possède pas d'activité propre, mais la protéine Ago2 à laquelle il se fixe est l'unique protéine des 4 argonautes (Ago1-4) présentant une activité catalytique endonucléase capable de cliver un ARNm (Liu et al., 2004).

Le complexe RISC se fixe sur l'ARNm cible à l'aide de la complémentarité, partielle ou totale, entre la séquence du miARN et celle de l'ARNm. D'après Chi et ses collaborateurs, cette fixation se fait majoritairement dans la région codante de l'ARNm, à hauteur de 50%, tandis que dans 46% des cas elle fait en 3'-UTR et dans 4% des cas en 5'-UTR (Chi et al., 2009). Cette complémentarité non-nécessairement parfaite permet aux miARNs de réguler plusieurs centaines d'ARNm potentiels (He et al., 2017; Thomson et al., 2011).

Le mode de fixation du miARN à l'ARNm n'est pas encore tout à fait compris. Effectivement, on a longtemps pensé que la fixation du miARN nécessitait une complémentarité parfaite entre sa partie *seed* (les nucléotides 2 à 8 en 5') et un appariement presque complémentaire

dans la région 3', avec donc une partie centrale ne correspondant pas forcément (Filipowicz et al., 2008) (voir Figure 16). Il s'agit du modèle canonique de la fixation des miARNs.

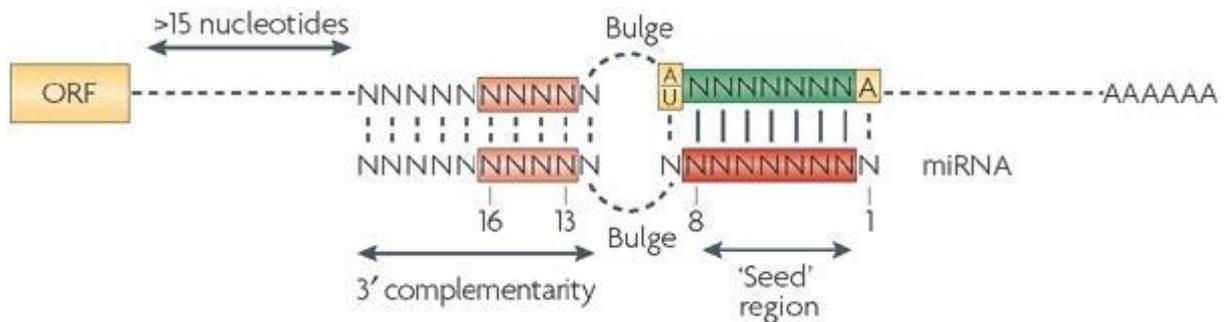


Figure 16 : *Modèle canonique de la fixation d'un miARN sur un ARNm. La complémentarité entre la région seed et l'ARNm doit être parfaite, tandis qu'elle peut être complète ou partiellement dans la région complémentaire en 3'. Entre ces deux extrémités, le « bulge » est un renflement où la complémentarité est optionnelle. Issue de (Filipowicz et al., 2008).*

Cependant ce modèle ne s'applique pas à toutes les fixations des miARNs (Vella et al., 2004). La fixation des miARNs via la séquence seed ne représenterait finalement que 60-80% des fixations tandis que le reste dépend d'une fixation complémentaire de la région 3' (Bofill-De Ros et al., 2019; Broughton et al., 2016; Helwak et al., 2013). Cette fixation via la région 3' est dite non-canonique (Figure 17).

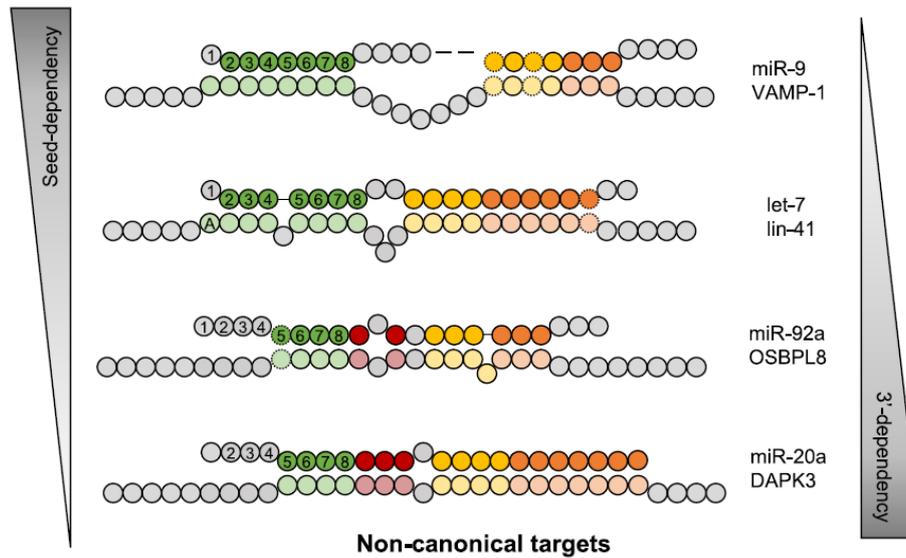


Figure 17 : Modèle non-canonique de la fixation d'un miARN sur un ARNm. Dans ce modèle, la complémentarité entre la région 3' et l'ARNm est inversement corrélée à celle entre la région seed et l'ARNm. Issue de (Bofill-De Ros et al., 2019).

Une fois le complexe RISC associé à l'ARNm cible, plusieurs mécanismes d'inhibition peuvent avoir lieu. Plusieurs observations suggèrent que les mécanismes d'inhibition induits par cette fixation du complexe RISC seraient dépendants de la complémentarité entre les miARN et l'ARNm cible (Filipowicz et al., 2008). Il s'agirait alors d'une inhibition de la traduction lors d'une complémentarité partielle, tandis qu'une complémentarité totale engendrerait la déanylation et la dégradation de l'ARNm cible.

L'interférence dans la synthèse protéique peut avoir lieu au moment de son initiation (Humphreys et al., 2005; Mathonnet et al., 2007) en inhibant la reconnaissance de la coiffe ou le recrutement de la sous-unité ribosomique 60S. Elle peut aussi se faire durant l'étape l'élongation (Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006) avec un détachement du complexe ribosomique ou une dégradation du peptide.

Enfin, la protéine Ago2 ayant une activité endonucléase, la fixation du complexe RISC est aussi capable de provoquer la déstabilisation si ce n'est la dégradation de l'ARNm cible (Eulalio et al., 2009; Wu et al., 2006).

Le miARN, à l'aide du complexe RISC auquel il appartient, peut se fixer de manière complémentaire (partiellement ou totalement) à certains ARNm. En fonction de la stabilité de cette fixation l'ARNm peut être dégradé ou sa traduction inhibée.

3. *miARNs et MAF*

3.1 L'intérêt clinique des miARNs

Au cours des dernières années de nombreuses fonctions ont été attribuées aux miARNs. Cela va de la régulation de l'immunité (Kim et al., 2017) à la différenciation des cellules souches (Mahabadi et al., 2019; Wang et al., 2019a), de l'embryogenèse (Mahabadi et al., 2019) à la carcinogenèse (Wang et al., 2019b). Cela s'explique à la fois par la profusion de miARNs identifiés chez l'Homme et par leur activité de régulation post-transcriptionnelle pouvant chacun agir sur plusieurs centaines de voies de signalisation (He et al., 2017; Thomson et al., 2011). On estime ainsi que 60% du génome des mammifères est régulé par les miARNs (Hafner et al., 2012).

De manière intéressante, les miARNs sont en partie exportés en dehors de la cellule via des vésicules extracellulaire (Eguchi et al., 2017) ce qui leur confère un rôle dans le maintien l'homéostasie (Desdín-Micó and Mittelbrunn, 2017). Ces vésicules, qu'il s'agisse d'exosomes ou de microvésicules, permettent le transport des miARNs dans tous les fluides corporels tels que le sang, l'urine ou encore la salive (Hanson et al., 2009). De plus, les exosomes contenant des facteurs de protections contre la dégradation par RNases, cela confère aux miARNs une demi-vie relativement importante avec une moyenne de 119 heures (Gantier et al., 2011). Ainsi les vésicules extracellulaires permettent à la fois une communication entre les cellules pathologiques, mais aussi avec le reste de l'organisme de manière spécifique grâce aux protéines et lipides membranaires présents à la surface des vésicules (Maas et al., 2017; Mulcahy et al., 2014). L'intégration du contenu de ces vésicules (miARNs, siARN, ARNm, protéines, lipides, ...) dans les cellules cibles module directement les voies de signalisations (Kornek and Schuppan, 2012).

Outre le sérum, certains miARNs sont retrouvés de manière spécifique dans certains organes et sont responsables de la régulation de voies physiologiques particulières (Ludwig et al., 2016). Dans le foie, les miARNs sont particulièrement abondants et impliqués dans la régulation de l'inflammation, l'apoptose, le métabolisme des lipides ou encore la régénération hépatique (Bala and Szabo, 2012; Bala et al., 2012; McDaniel et al., 2014; Soares do Amaral et al., 2016; Szabo and Satishchandran, 2015).

Ainsi les miARNs peuvent inhiber différentes voies de signalisations physiologiques, ce qui en fait des éléments clés de la régulation physiopathologique. Or les miARNs sont libérés au niveau local et systémique. Au niveau systémique l'action des miARNs est possible grâce à leur encapsulation vésiculaire qui leur confère une protection contre les RNases. Chez l'Homme, près de 70% des miARNs sont retrouvés dans le foie. Ainsi l'hypothèse d'une signature composée de miARNs circulants spécifiques du développement de pathologies hépatiques apparaît comme un outil pertinent du suivi de la MAF.

Ainsi la détection et la quantification de miARNs circulants, par prélèvement sanguin peu invasif, permettrait potentiellement le repérage précoce de la pathologie, d'évaluer sa sévérité ainsi que de déterminer sa progression et d'en faire son suivi, notamment pour évaluer la réponse au traitement.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a été mené en suivant une stratégie de miARNs candidats identifiés dans la littérature pour leurs implications dans les voies physiopathologiques impliquées dans la cancérogénèse et la MAF. Nous avons sélectionné le miR-122 qui est spécifique et majoritaire dans le foie et impliqués dans différentes voies de signalisations liées à la MAF comme l'activation du système immuno-inflammatoire, la perméabilité intestinale ou la maturation du collagène dans la fibrose. Le miR-155 est un oncomiR impliqué dans les processus immuno-inflammatoires qui a été associé à la sévérité du CHC. Le miR-21 est le miARN majoritairement exprimé dans les carcinomes humains, il potentialise la stéatose et l'inflammation hépatique. Le miR-34a* est le brin complémentaire de l'un des miARNs les plus dérégulés lors de stéatohépatite, avec lequel il agit en synergie. Le miR-126* est l'un des rares miARNs qui a été décrit comme surexprimé particulièrement dans le contexte du CHC lié à l'alcool. Le miR-29a est décrit comme un miARN suppresseur de tumeur dont la perte d'expression a été liée à la progression du CHC et la perméabilité intestinale. Le miR-212 est un miARN clé dans la régulation de la perméabilité intestinale qui impacte aussi l'activation des CEF lors de la fibrogenèse. Enfin, le miR-223 est produit majoritairement par les cellules

du système immunitaire et impacte l'infiltration des polynucléaires neutrophiles ainsi que la production de ROS.

3.2 miR-122

Le miR-122 est l'un des premiers miARNs identifié comme étant spécifique d'un tissu. En effet, le miR-122 n'est présent qu'en faible quantité en dehors du foie, alors qu'au sein de ce dernier il représente approximativement 72% des miARNs matures synthétisés (Lagos-Quintana et al., 2002).

Ce taux de production fait du miR-122 un miARN d'intérêt tout particulier dans l'étude des pathologies hépatiques, mais le rend dans un même temps peu spécifique d'une forme d'hépatopathie particulière. Ainsi, dans les formes d'hépatites virales il a été démontré que le miR-122 régule la réplication virale du VHC et du VHB (Song et al., 2015). L'accumulation de la charge virale du VHC est ainsi corrélée à celle du miR-122 tandis que celle du VHB y est inversement corrélée. En préclinique, chez des souris possédant une délétion du gène du miR-122, Tsai et ses collaborateurs ont observés l'apparition d'une stéatose à la naissance qui progresse vers une forme de stéatohépatite non-alcoolique (NASH), une fibrose puis un CHC à long-terme (Tsai et al., 2012).

Dans le cadre de la MAF, le miR-122 présente un rôle de médiateur entre les hépatocytes et les cellules du système immunitaire (monocytes, macrophages) via transfert horizontal. Ainsi, les cellules immunitaires internalisant les vésicules contenant le miR-122 sont sensibilisées au LPS circulant et présentent un phénotype pro-inflammatoire via l'inhibition directe par le miR-122 de HO-1 qui lève l'inhibition de Nox2 (ce qui réduit les protections cellulaires contre les dommages causés par les cytokines/ROS) (Momen-Heravi et al., 2015a).

D'autre part, le miR-122 a été impliqué dans la perméabilité intestinale en provoquant la dégradation des ARNm de l'occludine, ce qui résulte en une perte des jonctions serrées des entérocytes à l'origine de l'imperméabilité (Ye et al., 2011). Ce rôle du miR-122 est notamment impliqué dans la physiopathologie de la SHA et l'HAA, mais récemment il a été démontré qu'une prise de probiotique permet une réduction de la perméabilité intestinale via une réduction du taux de miR-122 ce qui prévenait l'apparition de la MAF (Li et al., 2016).

Dans un même temps, le miR-122 serait associé à la fibrogenèse en modulant la maturation du collagène (Li et al., 2013) et serait libéré en plus grande quantité via des exosomes dès les premières atteintes de MAF (Bala et al., 2012; Momen-Heravi et al., 2015b).

En terme de biomarqueur, le miR-122 a surtout été étudié dans un contexte de CHC, et notamment d'origine virale où il permettrait de différencier les patients atteints de CHC d'origine virale des patients atteints de VHC sans CHC (Ali et al., 2017). Il s'agit aussi d'un marqueur de la sévérité du CHC puisqu'une sur-expression de miR-122 est associée à une perte de viabilité des cellules hépatiques ainsi que le risque de métastase et d'invasion (Ma et al., 2018). A contrario, une sous-expression du miR-122 est associée à une résistance au Sorafenib (Xu et al., 2016), le traitement de référence pour les formes de CHC avancés. Cette résistance passe notamment par une sensibilisation à l'apoptose IGF-1R et Fox dépendante (Kumar et al., 2017; Xu et al., 2016).

Le miR-122 est le miARN majoritaire au niveau hépatique alors qu'il n'est que peu produit dans les autres organes. La spécificité du miR-122 pour le foie en fait un marqueur d'intérêt de la physiopathologie hépatique. Le miR-122 a été dans la littérature associé à de nombreux troubles hépatiques de par son implication dans la sensibilité du système immunitaire au LPS, dans la maturation du collagène dans le cas de la fibrose, de la viabilité cellulaire et les processus migratoires dans le CHC, ou encore dans la résistance au Sorafenib.

[3.3 miR-155](#)

Initialement remarqué pour sa prépondérance dans le thymus et la rate, le miR-155 a été originellement identifié comme spécifique du système hématopoïétique (Mashima, 2015; Testa et al., 2017). Les souris présentant une délétion du gène codant le miR-155 sont viables et présentent uniquement une fonction défectueuse de l'immunité (lymphocytes B, T et les cellules dendritiques) (Rodriguez et al., 2007).

Il a ensuite été parmi les premiers miARNs identifiés comme étant un oncomiR (Volinia et al., 2006), c'est-à-dire un miARN favorisant le développement de masses tumorales. En effet, le

miR-155 a été associé à de nombreux cancers, parmi eux le cancer du sein, du col de l'utérus, du rein, le lymphome ou encore le cancer du foie (Liu et al., 2018). Dans cette méta-analyse, Liu et ses collaborateurs concluent qu'une surexpression de miR-155 est associée avec un mauvais taux de survie dans les carcinomes humains.

Dans le cas de la MAF, le miR-155 étant particulièrement associé au système pro-inflammatoire des monocytes et macrophages, régulant notamment les voies du NFκB et des TLR (Markopoulos et al., 2018), il a aussi été associé à la SHA et la fibrogenèse (Bala et al., 2016). Sa synthèse serait corrélée avec la cirrhose (Ashmawy et al., 2017) et associée au CHC (Ashmawy et al., 2017; Fu et al., 2017; Zhang et al., 2016b). En effet le miR-155 promouvrait la prolifération cellulaire en inhibant des suppresseurs de tumeur comme l'IGFBP-3 tout en activant des oncogènes comme les IGF-II et IGF-1R (El Tayebi et al., 2015). De plus, le miR-155 serait un activateur de l'invasion et de la migration tumorale via l'activation de la voie du Pi3K/AKT à l'origine de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Fu et al., 2017; Kong et al., 2016; Li et al., 2017a; Yan et al., 2013; Zhang et al., 2016b). Ainsi le miR-155 apparaît comme un régulateur essentiel dans l'hépatocarcinogénèse, associé au grade de la tumeur et marqueur d'un mauvais pronostic (Ji et al., 2016; Zhang et al., 2016b).

Le miR-155, initialement décrit pour son implication dans les processus immuno-inflammatoire est désormais identifié comme un oncomiR et métastamiR, c'est-à-dire un miARN impliqué dans les processus de cancérogenèse et de métastase. Cet effet passe notamment par l'inhibition par le miR-155 de gènes suppresseurs de tumeur (IGFBP-3, SOCS1/6, PTEN) et l'activation de pro-oncogènes (IGF-II, IGF-1R). Ainsi le miR-155 semble particulièrement associé à la sévérité et au pronostic des cas de CHC.

[3.4 miR-21](#)

Le miR-21 est un miARN abondant particulièrement étudié pour son intérêt dans la cancérogenèse puisqu'il s'agit du seul miARN surexprimé dans les 6 cancers les plus fréquents (Volinia et al., 2006). En plus d'être un oncomiR, il a été caractérisé de métastamiR pour son implication dans les phénomènes de métastases (Wotschovsky et al., 2012; Zhou et al., 2013).

Le miR-21 semble jouer un rôle prépondérant dans la balance entre différenciation cellulaire et pluripotente (Singh et al., 2008, 2015).

Au niveau du foie, le miR-21 a été identifié comme un potentialisateur de la stéatose hépatique via STAT3 (Belloni et al., 2018; Calo et al., 2016) et de l'inflammation via NFκB (Wu et al., 2018). Il est ainsi potentiellement impliqué dans les phénomènes d'accumulation lipidique et d'inflammation à l'origine même d'une fibrogenèse et de l'évolution vers un cancer du foie (Wu et al., 2016).

Il est d'ailleurs synthétisé en plus grande quantité dans les cellules tumorales du foie en comparaison au tissu sain, et son excrétion sérique est elle aussi augmentée (Amr et al., 2016; Guo et al., 2017; Ladeiro et al., 2008; Thurnherr et al., 2016; Zhuang et al., 2016). De plus, le miR-21 a été associé à l'invasion tumorale et la migration cellulaire dans le cadre du CHC (Zhou et al., 2013). De manière intéressante, la réduction du taux de miR-21 a été associée à une baisse de la prolifération cellulaire, de l'invasion et de la métastase (Hou and Quan, 2017) ainsi qu'à une mortalité cellulaire par apoptose (Yin et al., 2016).

Le miR-21 apparait comme l'un des oncomiR principaux de par son expression augmentée dans la plupart des carcinomes, de son implication dans les phénomènes de prolifération cellulaire, de mortalité et de migration. En particulier dans le cas du CHC.

[3.5 miR-34a*](#)

Le miR-34a est un miARN ubiquitaire identifié en 2007 comme étant sous l'influence de la protéine suppresseur de tumeur p53 (Chang et al., 2007; Tarasov et al., 2007). L'activation du miR-34a par p53 induit l'apoptose ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Chang et al., 2007; Raver-Shapira et al., 2007; Tarasov et al., 2007). Ce mécanisme anti-prolifératif est soutenu par une boucle de rétrocontrôle positif. En effet, il a été démontré que la production de miR-34a induite par p53 inhibe le Silent Information Regulator 1 (SIRT1), ce qui promeut l'acétylation de p53 (Xia et al., 2017; Yamakuchi et al., 2008).

Or, plusieurs études récentes s'entendent sur le fait que le miR-34a et le miR-34a* sont impliqués dans les mêmes voies de régulations (Córdova-Rivas et al., 2019; Guennewig et al.,

2014; Li and Li, 2016) et agissent en synergie (Guennewig et al., 2014). Le miR-34a* a particulièrement été associé à un rôle anti-prolifératif et anti-métastatique dans différents cancers (Córdova-Rivas et al., 2019; Mikkelsen et al., 2019; Werner et al., 2017) et serait impliqué comme le miR-34a dans la réponse inflammatoire associée au LPS induite par le TNF α qui est une cible directe du miR-34a* (Guennewig et al., 2014).

En termes d'hépatopathie, le miR-34a est l'un des miARNs les plus dérégulés dans les cas de stéatohépatite (Li et al., 2009). Via son inhibition de SIRT1, le miR-34a jouerait un rôle prépondérant dans la promotion du stress oxydatif et l'accumulation d'acide gras (Shen et al., 2009; Yin et al., 2012). De plus, les miR-34a et miR-34a* régulent aussi les MMP-1 et MMP-2 qui sont impliqués dans la fibrose hépatique (Córdova-Rivas et al., 2019; Li et al., 2015b; Meng et al., 2012; Wan et al., 2017a). Dans le cas du CHC, les rapports sont contradictoires. Le miR-34a a été plusieurs fois reporté comme étant associé à une perte de la sensibilité à l'apoptose suite à une alcoolisation chronique (Dippold et al., 2013; McDaniel et al., 2014; Meng et al., 2012) ce qui pourrait s'expliquer par une perte fréquente de l'activité de p53 dans les cas de CHC (Guichard et al., 2012). Dans d'autres cas, il est estimé que le miR-34a agit dans le foie comme un suppresseur de tumeur (Dang et al., 2013). Cependant il serait tout de même associé avec le pouvoir invasif des cellules cancéreuses, le grade du CHC ainsi que le taux de survie (Tian et al., 2017; Wan et al., 2017b).

Plusieurs études s'entendent donc sur le fait que les 2 miARNs issus d'un même pré-miR peuvent avoir des effets biologiques complémentaires via une redondance de leurs gènes cibles (Uchino et al., 2013). De manière intéressante, malgré le fait qu'il soit considéré initialement comme le brin inactif, le miR-34a* présentent 1718 gènes cibles alors que le miR-34a n'en présentent que 585 (Li and Li, 2016).

Le miR-34a* est le brin complémentaire d'un miARN ubiquitaire particulièrement dérégulé durant le développement d'hépatopathies. Or il a récemment été observé que le miR-34a* en plus de réguler les mêmes voies de signalisations que le miR-34a, avait une action synergique avec le miR-34a qui potentialise leurs effets propres. Ainsi le miR-34a* est impliqué directement dans l'inflammation LPS dépendante, dans les processus de fibrose ainsi que dans certains processus de cancérogenèse.

3.6 miR-126*

Le miR-126 est usuellement décrit comme un microARN du système artériel, retrouvé majoritairement au sein des cellules endothéliales, contrairement à son brin complémentaire qui est retrouvé habituellement dans le cœur et les poumons (Poissonnier et al., 2014).

Ces dernières années, le miR-126 a été associé aux hépatites et aux CHC d'origines virales (Ali et al., 2017; Xiang et al., 2017). Il semble avoir un rôle anti-tumorale avec une fonction inhibitrice de la prolifération tumorale et de l'angiogénèse dans le cas du CHC (Gong et al., 2017; Hu et al., 2016; Jing et al., 2017). Or, l'expression du miR-126* est positivement corrélée à celle du miR-126, et leur réduction apparait comme un marqueur de mauvais pronostic dans le CHC (He et al., 2014).

Pour sa part, le miR-126* semble avoir une fonction dans la prolifération endothéliale (Schober et al., 2014). De plus, lors d'une comparaison d'un panel de miARNs en fonction de l'étiologie du CHC, Ladeiro et ses collaborateurs ont trouvés des taux de miR-126* intrahépatiques réduits chez les CHC liés à l'alcool comparés aux autres étiologies de CHC ainsi que les témoins sains (Ladeiro et al., 2008).

Le miR-126* est l'un des rares miARN à avoir été identifié dans la littérature spécifiquement dans le cadre du CHC d'origine alcoolique. Son effet pourrait s'expliquer par une activité d'angiogénèse ce qui expliquerait la corrélation inverse entre son expression et le mauvais pronostic du CHC.

3.7 miR-29a

Le miR-29a est l'un des 3 membres de la famille des miR-29 (a,b,c). Il a été initialement décrit pour son implication dans la réplication virale du VIH (Ahluwalia et al., 2008; Hariharan et al., 2005) avant d'être étudié dans le cadre des cancers. Dans ce cadre, le miR-29a semble régulé négativement avec l'avancé de nombreux cancers (prostate, leucémie, lymphomes, ...) mais régulé positivement avec le cancer colorectal et le cholangiocarcinome (Wang et al., 2018b).

Ainsi, dans le cancer de la prostate Li et ses collaborateurs ont décrit le rôle du miR-29a dans l'induction de l'apoptose et son activité inhibitrice de la prolifération cellulaire (Li et al., 2015a). Dans le cancer gastrique, le miR-29a serait impliqué dans l'inhibition de l'angiogenèse, les processus prolifératif et métastatiques (Zhang et al., 2016a). Enfin, le miR-29a est aussi régulé positivement dans certaines cellules cancéreuses résistantes aux traitements chimiothérapeutiques, notamment dans le cancer du sein (Zhong et al., 2013).

Dans le foie, la famille des miR-29 semble sous-exprimée lors de la progression de la fibrose que ce soit chez l'Homme ou l'animal (Roderburg et al., 2011). Cette sous-expression serait corrélée à la surproduction de TGF- β lors de l'activation des CEF (Bandyopadhyay et al., 2011). Ainsi la sur-expression de miR-29 dans un modèle murin réduirait l'expression de collagènes (Bandyopadhyay et al., 2011; Roderburg et al., 2011), mais aussi les dommages hépatiques en inhibant différentes molécules pro-apoptotiques (Bax, NF κ B, FADD, ...) ou au contraire agissant sur des éléments anti-apoptotiques comme la phosphorylation d'AKT (Tiao et al., 2014). De plus, l'augmentation du miR-29a serait à l'origine d'une baisse d'activité des voies de TLR2 et TLR4 via une réduction de MyD88 ou de la production de facteurs inflammatoires tels que l'IL-1 β , le TNF- α ou le TGF- β (Huang et al., 2018; Lin et al., 2018). De manière intéressante, le taux de miR29a circulant semble aussi réguler la perméabilité intestinale chez des patients atteints d'un syndrome du côlon irritable (Zhou et al., 2010).

Dans le cas du CHC, différentes études s'accordent sur une réduction du taux de miR-29a dans le tissu tumoral comparé au tissu sain environnant (Ma et al., 2019; Zhang et al., 2018b). Cette expression du miR-29a intratumoral serait inversement corrélée à la taille de la tumeur et l'invasion vasculaire (Zhang et al., 2018b). Ces résultats s'expliquent par une réduction de la prolifération mir-29a dépendante dans les cas de CHC (Ma et al., 2019; Zhu et al., 2012). Ainsi le faible taux sérique de miR-29a apparait comme un facteur de risque indépendant associé au mauvais pronostic et un taux de survie réduit (Cho et al., 2017; Zhang et al., 2018b).

Le miR-29a est un miARN suppresseur de tumeur qui inhibe à la fois la prolifération anarchique des cellules tumorales, les processus inflammatoires, l'apoptose précoce, mais aussi l'angiogenèse et la migration ainsi que la réponse à certains traitements

chimiothérapeutiques. Dans le cas de la MAF sa perte d'expression semble corrélée à la fibrose et à la progression du CHC, ainsi que potentiellement à la dérégulation de la perméabilité intestinale et l'inflammation.

3.8 miR-212

Le miR-212 est un miARN assez peu étudié malgré son implication dans de nombreux cancers (thyroïde, sein, gastrique, CHC, ...), les études s'intéressant plus généralement au miR-132 qui provient du même transcrit que le miR-212 avec lequel il forme un cluster. Malgré cela le miR-212 est l'un des rares miARNs à avoir été associé à un comportement motivé de consommation de drogue (Kenny, 2014).

Le miR-212 a aussi été mis en lien avec la perméabilité intestinale. En effet, suite à l'exposition à l'alcool les cellules Caco-2, des cellules formant une monocouche ressemblant morphologiquement à l'épithélium intestinal, les cellules sur-exprimaient le miR-212 tandis que la perméabilité de la barrière était augmentée (Tang et al., 2008a). Ce résultat est retrouvé dans des biopsies du colon réalisées chez des patients souffrant de MAF comparés à des témoins sains : le miR-212 est sur-exprimé ce qui induit une réduction de la traduction de l'ARNm de Zonula occludens 1, et donc une hyperperméabilité intestinale (Tang et al., 2008a). Le rôle du miR-212 dans cette réaction est bien confirmé par l'utilisation d'anti-miR-212 (Tang et al., 2015).

Au niveau hépatique, le rôle du miR-212 dans le phénomène de fibrose est plus controversé. Effectivement, le miR-212 est retrouvé augmenté dans le foie de différents modèles animaux d'atteintes hépatiques (le High Fat Diet, ou l'exposition au CCl₄) (Xiao et al., 2016; Yu et al., 2018; Zhu et al., 2018) cependant si certains associent le miR-212 au TGF- β , et donc concluent que le miR-212 est un activateur des CEF (Zhu et al., 2018), d'autres trouvent au miR-212 un rôle d'inhibiteur dans l'activation des CEF (Yu et al., 2018). De plus, il est reporté une baisse du taux d'expression du miR-212 dans les CHC comparé au tissu sain (Dou et al., 2015; Jia et al., 2018), ainsi que dans le sérum de ces patients (Wang et al., 2018a). Cette sous-expression est expliquée par un rôle du miR-212 dans l'inhibition de la prolifération tumorale, de la viabilité ou encore de la migration (Dou et al., 2015; Jia et al., 2018) ainsi que dans l'activation de l'apoptose (Dou et al., 2015). Enfin, le taux de miR-212 est inversement corrélé à la taille

de la tumeur et à son pouvoir invasif, ce qui en fait un marqueur de mauvais pronostic du CHC (Dou et al., 2015; Wang et al., 2018a).

Malgré des rapports contradictoires, le miR-212 semble impliqué dans les processus d'activation des CEF lors de la fibrogenèse en plus d'être un facteur clé dans la perméabilité intestinale. Dans le cas du CHC la perte de miR-212 semble induire une perte de l'inhibition de la prolifération tumorale, de la viabilité et de la migration et donc être corrélée à la taille de la tumeur.

3.9 miR-223

Le microARN-223 a été pour la première fois décrit pour son rôle dans le système hématopoïétique (Johnnidis et al., 2008). Johnnidis et ses collaborateurs ont ainsi caractérisé son rôle dans la différenciation hématopoïétique en agissant sur les cellules souches hématopoïétiques, les cellules myéloïdes, érythroïdes, ou encore les lymphoïdes. Le miR-223 est donc un facteur clef dans le développement et l'équilibre du système immunitaire (Haneklaus et al., 2013). Il s'agit d'un des microARNs les plus exprimés par les cellules neutrophiles (Li et al., 2017b), et sa libération par les macrophages différenciés permet d'induire la différenciation des monocytes intégrant les vésicules extracellulaire le contenant (Valadi et al., 2007).

Dans le foie le miR-223 régule la différenciation des cellules immunitaires, la polarisation des macrophages, l'infiltration et l'activation des cellules neutrophiles, l'activation des inflammasomes, l'homéostasie du fer et le métabolisme du cholestérol, la prolifération cellulaire, la résistance aux traitements, les capacités métastatiques des cellules tumorales ou encore les voies de signalisation de l'inflammation (Ye et al., 2018).

Dans un contexte d'exposition à l'alcool, le taux sérique de miR-223 est supérieur à celui de témoins n'ayant pas consommé de boissons alcoolisées (Li et al., 2017b; Zheng et al., 2017). Ce résultat est d'ailleurs retrouvé dans un modèle animal d'exposition chronique à de l'alcool et de binge (Li et al., 2017b) (voir paragraphe 4.2 – Chronique plus binge). Dans cette dernière étude, Li et ses collaborateurs démontrent que le miR-223 empêche l'infiltration de

neutrophiles et la production de ROS dans le cadre de la MAF, ce qui rend les souris sans miR-223 particulièrement sensibles aux dommages hépatiques d'origine alcoolique mais pas aux atteintes chroniques induites par une exposition au tétrachlorure de carbone (CCl₄) (Schueller et al., 2017).

Ainsi chez l'Homme le taux de miR-223 sérique est corrélé à l'évolution de la fibrose (Oksuz et al., 2015) et pourrait être utilisé comme biomarqueur non-invasif de la fibrose avancée (F2 et plus) (Shaker and Senousy, 2017). Dans le cas du CHC, une réduction de l'expression du miR-223 dans les hépatocytes semble prédisposer au développement du CHC (Bhattacharya et al., 2016; Wong et al., 2008). Cette prédisposition semble passer par la non-inhibition de facteurs oncogéniques induisant une instabilité chromosomique (Wong et al., 2008), tandis qu'une réexpression du miR-223 *in vitro* induit l'apoptose et réduit la prolifération tumorale (Dong et al., 2017b). De plus, le miR-223 promeut les phénomènes métastatiques (Dong et al., 2014), et un faible taux de miR-223 rend les macrophages hypersensibles aux stimulations par le LPS et au phénotype pro-inflammatoire (Zhuang et al., 2012), mais est associé aussi à une résistance aux traitements, notamment à la non-réponse au Sorafenib (Gyöngyösi et al., 2014) ou à l'augmentation du taux de récurrence du CHC post-transplantation (Han et al., 2012).

Contrairement aux autres miARNs sélectionnés, le miR-223 est produit directement par les cellules du système immunitaire. Dans un contexte de MAF le miR-223 est sur-exprimé et agit dans l'inhibition de la production de ROS et l'infiltration de neutrophiles. Sa quantification sérique semble ainsi associée au stade de fibrose du foie. Dans les hépatocytes cependant, la baisse d'expression du miR-223 est retrouvée dans le cas du CHC, ce qui lèverait l'inhibition de certains facteurs oncogéniques et serait associé à une résistance au Sorafenib.

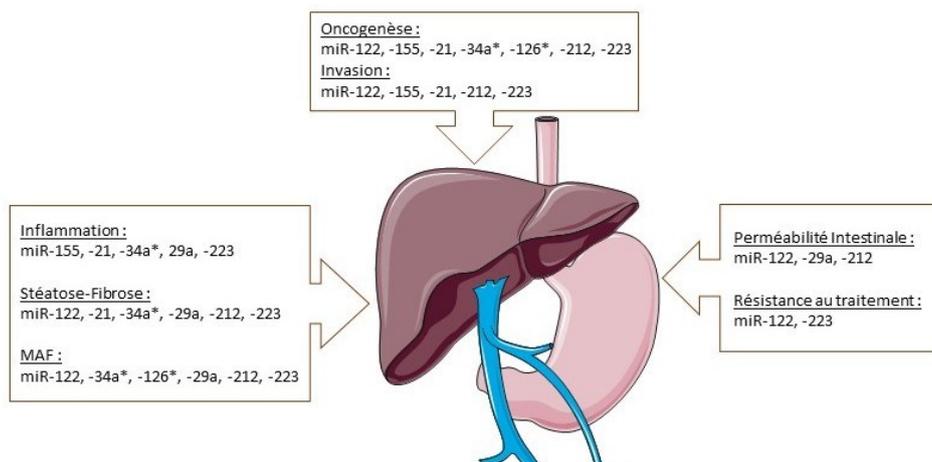


Figure 18 : Résumé des 8 miARNs sélectionnés et leurs implications dans les voies physiopathologiques de la MAF et du CHC.

4. Modélisation de la MAF

Les formes sévères de MAF comme le CHC étant généralement repérées lors d'épisode de décompensation foudroyante, avec un tableau clinique bruyant et une insuffisance hépatique, l'obtention de prélèvements biologiques s'avère complexe. Afin d'améliorer nos connaissances sur cette pathologie ainsi que d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques, il est donc nécessaire de mettre au point des modèles pertinents de la MAF.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la fois à la modélisation *in vitro* du CHC lié à l'alcool et à la modélisation *in vivo* des formes avancées de la MAF chez la souris.

4.1 La modélisation *in vitro*

La modélisation cellulaire hépatique

Les études *in vitro* dans le domaine de l'hépatologie se font majoritairement à partir de 3 types de cellules : des hépatocytes primaires, isolés à partir de prélèvements de foies humains voir de rongeurs ; des lignées cellulaires immortalisées à partir d'hépatomes humains ; ou bien des cellules souches embryonnaires ou pluripotentes qui sont soumis à un protocole de différenciation en hépatocyte (Zeilinger et al., 2016).

Cependant il n'existe pas de modèle *in vitro* parfait, et chacune de ces cultures présentent des avantages ainsi que des inconvénients. Ainsi si les hépatocytes primaires humains (HPH) apparaissent tout naturellement comme le matériel d'étude de référence, plusieurs limitations empêchent de travailler sur ces cellules. La première est la rareté de ces cellules issues de prélèvements sains, généralement de surplus de greffons hépatiques ou de résections chirurgicales, qui nécessitent des moyens techniques et chirurgicaux particuliers (Kleine et al., 2014). De plus la méthodologie d'isolement de ces cellules peut provoquer des altérations dans les fonctions des cellules les rendant inutilisables. Enfin les hépatocytes sont des cellules polarisées, ce qui est un élément clé dans leur fonctionnement (Treyer and Müsch, 2013). Or après un temps de culture de plusieurs jours en 2 dimensions (2D) les HPH commencent à perdre leurs phénotypes, devenant des cellules arrondies dédifférenciées ce qui s'accompagne d'une perte de fonctionnalités (Schyschka et al., 2013; Smith et al., 2012).

Les nouvelles techniques de culture cellulaire en 3 dimensions (3D) permettent de restituer en partie l'environnement hépatique et donc d'améliorer les conditions de culture, mais même en utilisant ces procédures les HPH ne survivent pas plus de 5 semaines (Bell et al., 2016; Messner et al., 2013). D'après Bhogal et collaborateurs, l'isolement d'hépatocytes provenant de patients atteints de MAF s'avère plus compliqué que n'importe quelle autre pathologie avec un taux de succès de seulement 29% (Bhogal et al., 2011). Ce faible taux de réussite combiné à la rareté des échantillons de foie prélevés chez ces patients explique donc le manque de littérature de cultures *in vitro* d'hépatocytes atteints de MAF.

Les caractéristiques des HPH peuvent permettre certaines études toxicologiques, mais les HPH étant d'origines différentes (chaque prélèvement venant d'un patient différent) et ne pouvant pas proliférer en culture, cela complique la reproductibilité des expérimentations. Afin de palier à ce problème, de nombreuses lignées cellulaires d'origine hépatiques ont été développées. Il s'agit de cellules d'origine tumorale, issus de prélèvements d'hépatomes de différentes origines, qui ont des capacités de prolifération très développées en général ainsi qu'un métabolisme similaire aux hépatocytes (Zeilinger et al., 2016). Elles sont majoritairement utilisées dans les études de carcinogénèse et les études pharmacologiques étudiant de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cependant la plupart de ces lignées étudiées en 2D présentent peu de fonctions hépatiques lorsqu'elles ne sont pas modifiées génétiquement (Liu et al., 2013; Novotna et al., 2011). De plus, pour l'étude spécifique de la MAF il est à noter qu'aucune lignée cellulaire hépatique n'est clairement qualifiée comme étant issue d'une tumeur d'origine alcoolique. Seules certaines, comme la lignée Huh-7 sont d'origine « non virale » sans que l'on ne sache précisément quelle est l'origine de la tumeur.

Enfin les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) et les cellules souches pluripotentes induites (CSPi) sont de récentes alternatives qui permettent de produire des hépatocytes en grande quantité et à façon. Pour des raisons éthiques, les CSEh sont très peu utilisées, tandis que les CSPi sont des cellules adultes dédifférenciées qui vont pouvoir être différenciées en hépatocytes suite à une exposition à des facteurs de croissances spécifiques (Talaie-Khozani et al., 2015). Afin de différencier ces cellules, il est donc nécessaires de les

exposer à différentes molécules présentent au cours des différentes étapes de l'organogénèse hépatique. De nombreux protocoles ont été mis au point, mélangeant différentes cytokines impliquées dans ce processus de différenciations, à différentes doses, selon différents temps d'exposition, afin d'obtenir des *hepatocyte-like cells* (Zeilinger et al., 2016). C'est-à-dire des cellules présentant des fonctions hépatiques mais aussi des phénotypes immatures ce qui induit une perte de fonction de ces cellules comparativement à des HPH (Baxter et al., 2015; Godoy et al., 2015). Comme pour les HPH ou les lignées cellulaires, les résultats obtenus via les CSPi semblent plus robustes lorsqu'un protocole en 3D est réalisé notamment dans le cadre de co-culture avec d'autres types cellulaires (cellules endothéliales, CEF, ...) (Takebe et al., 2013).

Plusieurs méthodologies *in vitro* permettent d'étudier les fonctions et pathologies hépatiques. En pratique la majorité des résultats de culture cellulaires est issue de la culture de lignées cellulaires, notamment du fait de leur taux de prolifération élevé et d'un bon taux de reproductibilité dans les différentes études. Nonobstant, de nouvelles méthodologies sont en développement afin de s'approcher au plus près de cellules hépatiques fonctionnelles, notamment via la culture en 3D afin de maintenir les fonctions des hépatocytes, ou la co-culture afin de se rapprocher de la composition tissulaire où près de 30% des cellules hépatiques ne sont pas des hépatocytes mais des CEF, des cellules de Kupffer, des cellules endothéliales, ... Pour ce qui est de l'étude de la MAF, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodologie (une lignée ou une procédure efficace) permettant d'étudier des cellules de patients atteints de manière stable et reproductible.

L'alcoolisation in vitro

Les premières études sur les effets de l'alcool *in vitro* ont été menées dans le cadre d'études toxicologiques afin d'estimer la concentration optimale d'éthanol à injecter lors d'une ablation percutanée via injection d'alcool dans le cadre du CHC (revoir paragraphe 1.4.5). En effet, après l'injection d'éthanol de nombreux effets secondaires ont été notés par les cliniciens, jusqu'à la mort de certains patients (Livraghi et al., 1988).

La majorité de ces études s'intéresse donc à des doses faibles à intermédiaire d'éthanol, entre 0 et 80mM en général, et sur des périodes de temps très courtes allant de 15s à 1 heure

(Tapani et al., 1996) jusqu'à 24 heures (Castaneda and Kinne, 2004; Higuchi et al., 2001; Shear et al., 1999). Le but étant pour celles-ci d'évaluer la concentration optimale d'éthanol déclenchant de l'apoptose mais pas de nécrose afin de réduire les répercussions du traitement sur les cellules hépatiques saines avoisinantes.

D'autres études se sont intéressées aux effets de l'alcool sur les hépatocytes dans le cadre de la MAF. C'est notamment le cas de Neuman et ses collaborateurs qui évoquent l'établissement d'un modèle de MAF *in vitro* dans les années 1990 après avoir exposé des cellules HepG2 à 80mM d'éthanol pendant 2 sessions de 24 heures (Neuman et al., 1993, 1999). Dans ces études Neuman s'intéressait particulièrement à l'induction de l'apoptose chez les cellules exposées à de l'éthanol. Cette méthodologie sera reprise notamment pour étudier l'implication mitochondrial et de cytokines pro-inflammatoire dans l'apoptose induite par l'éthanol (Pastorino and Hoek, 2000; Pastorino et al., 2003). Plus récemment Tang et ses collaborateurs ont aussi utilisé une méthodologie similaire (culture d'HepG2 pendant 48 heures à 87mM d'éthanol) afin d'évaluer les effets protecteur du resvératrol (polyphénol retrouvé notamment dans le vin rouge) contre le développement de stéatose (Tang et al., 2016).

Depuis ces publications, rares sont celles s'intéressant à l'effet de l'alcool *in vitro* sur les cellules hépatiques. Nous supposons que 2 éléments peuvent en être à l'origine. Tout d'abord la majorité de ces études a été réalisée sur des cellules de la lignée des HepG2, qui sont des cellules ayant une perte d'expression de l'ADH et du CYP2E1. Ainsi l'exposition à l'éthanol n'induit chez ces cellules que des effets directs, or une grande part des dommages hépatiques est la résultante de l'acétaldéhyde ou de la combinaison acétaldéhyde/éthanol.

Le second point discutable nous semble être le temps d'exposition à l'alcool. Effectivement il est compliqué de faire un parallèle entre un temps d'exposition chez l'Homme et des cellules en culture, cependant le CHC d'origine alcoolique nécessite des années d'exposition à des doses plus ou moins élevées d'alcool. Une exposition de 48 heures pour des cellules déjà cancéreuses qui sont plus résistantes que les cellules saines nous semble donc trop faible afin d'altérer de manière significative les voies de signalisations impliquées dans l'établissement d'une MAF. Cette hypothèse se base notamment sur les travaux *in vitro* sur la réponse au

Sorafenib où une exposition à une forte dose est maintenue pendant plusieurs mois afin d'induire une résistance au traitement (Dong et al., 2017a).

Dans la littérature, plusieurs études se sont intéressées aux effets toxiques aigus de l'éthanol, en exposant des cellules cancéreuses à de faibles doses d'éthanol sur des périodes allant de quelques minutes à 48 heures. Ces études avaient pour but de limiter l'inflammation due à la nécrose suite à une ablation percutanée, et non pas à étudier les effets de l'alcool chronique sur le fonctionnement hépatocytaire et le développement de la MAF. Nous proposons qu'une exposition à de l'éthanol pendant plusieurs mois est nécessaire afin d'observer les adaptations cellulaires à l'origine de la MAF, et ce sur des lignées cellulaires possédant un métabolisme opérant de l'éthanol.

4.2 La modélisation in vivo

Malgré plus de 60 années de recherches dans la modélisation animale de la MAF, il n'existe toujours pas à l'heure actuelle de modèle bien défini correspondant à la pathologie humaine. Cela s'explique par quelques différences physiologiques entre l'Homme et les rongeurs : le catabolisme de l'alcool est 5 fois plus efficient chez les rongeurs comparativement à l'Homme (Holmes et al., 1986). De plus le système immunitaire murin est différent du nôtre, notamment concernant la balance neutrophiles-lymphocytes. Les neutrophiles représentent 50-70% des leucocytes humains circulants contre 10-25% chez la souris. Les lymphocytes représentent 30-50% des leucocytes humains contre 75-90% chez la souris (Mestas and Hughes, 2004).

Ces 2 différences rendent les rongeurs résistants face à la MAF (Holmes et al., 1986). De plus, de nombreux facteurs prédisposant à la MAF rendent certains Hommes plus susceptibles que d'autres à consommation égale d'alcool (facteurs héréditaires, l'âge, le régime alimentaire, le tabagisme, l'ethnie, ...). Ces mêmes facteurs peuvent être retrouvés chez le rongeur, puisqu'à consommation et à éthanolémie égales, certaines souches de souris sont plus susceptibles aux atteintes hépatiques (Tsuchiya et al., 2012), de même chez les rats (Denucci et al., 2010).

L'effet genre est aussi un élément clé dans la modélisation animale, car comme chez l'Homme, les femelles développent plus rapidement une MAF avec des seuils de consommation inférieurs à ceux des mâles (Muller, 2006). Cet effet genre peut être expliqué par des taux d'alcool déshydrogénase gastrique réduits mais aussi par les œstrogènes qui rendent les cellules de Kupffer plus sensibles aux effets du LPS et à la production de cytokines (Soldin and Mattison, 2009).

Ainsi tous ces facteurs sont à prendre en compte lors de l'établissement d'un nouveau protocole de modélisation animale. Plusieurs méthodologies d'exposition à l'alcool sont disponibles, qu'elles soient volontaires en proposant une solution d'alcool diluée dans l'eau du biberon (avec un seul biberon d'eau alcoolisée, ou avec un second biberon d'eau pure à côté) ou dans un régime alimentaire liquide. Les rongeurs ayant une aversion naturelle pour l'alcool, la consommation peut être forcée afin d'atteindre des éthanolémies supérieures, par gavage ou par injection intra-péritonéal (I.P.) afin de modéliser une consommation aiguë de type *binge drinking*, ou par exposition à des vapeurs chargées en éthanol afin d'obtenir des éthanolémies importantes et constantes sur de longues périodes de temps.

Historiquement, les études animale s'intéressant à la MAF ont tendance à choisir une méthodologie d'exposition mimant la voie « naturelle » en passant par la route orale et l'ingestion gastrique/intestinale. Le but de ces protocoles étant d'obtenir des éthanolémies significatives (supérieures à 1,5g/L) sur de longues périodes de temps.

Consommation orale forcée *ad libitum*

La première méthodologie utilisée dans la modélisation de la MAF fut un paradigme de consommation orale forcée *ad libitum*. Dans cette méthodologie initialement décrite par Best et Hartroft (Best and Hartroft, 1949), de l'éthanol dilué entre 10 et 40% (v/v) est proposé dans l'unique biberon à disposition de l'animal pendant 8 à 78 semaines (Cook et al., 2007). En mettant l'alcool en présence dans l'unique source de liquide il était théorisé que l'éthanolémie, même si minime, serait à peu près constante durant la journée, et donc pendant plusieurs mois.



Cependant l'atteinte hépatique n'est que très minime, même après 1,5 an d'exposition. En effet, ce modèle permet de développer une stéatose légère avec une élévation des transaminases (Cook et al., 2007). Cependant il est aussi à noter que c'est l'unique méthodologie de modélisation de la MAF présentant une mortalité quasiment nulle.

En pratique, les rongeurs présentant une aversion naturelle à l'amertume de l'alcool, ils consomment donc moins de cette solution que s'il s'agissait d'eau pure. Ajouté à leur métabolisme efficace, l'éthanolémie n'est que de 0,5 à 0,7 g/L (jusqu'à 0,9 g/L si l'éthanol est dilué à 40%).

Régime liquide de Lieber-DeCarli

En 1949 Best et Hartroft n'avaient pas observé d'atteintes hépatiques chez les rats exposés 177 jours à un biberon contenant de l'éthanol à 15%, mais chez les rats recevant ce même traitement et un régime nutritionnel à l'origine de carences alimentaires (Best and Hartroft, 1949). A partir de ce constat, Lieber et collaborateurs ont présentés un modèle d'exposition où l'alcool est présent dans un régime alimentaire liquide qui remplace à la fois les croquettes habituelles et le biberon d'eau (Lieber et al., 1963).

A l'aide de ce protocole, la consommation journalière est de 3 fois supérieure à celle de la consommation d'alcool dilué dans l'eau, à 12-18 g/kg/24h. Cela permet l'obtention d'éthanolémies modérées, entre 1-1,5g/L (Lieber et al., 1963). Cependant les troubles hépatiques observés se limitent à une stéatose à la sévérité variable, sans atteinte avancée même après 9 mois d'exposition (Leo and Lieber, 1983).

Le régime Lieber-DeCarli (LDC) comprend : de la caséine (18% des calories), du gras (35% des calories, à base d'huile d'olive et de maïs), des vitamines solubles dans le gras (A, D, E, K) ou dans l'eau (B12), des minéraux et fibres, et de la dextrine/maltose (47% des calories). 36% des calories de la part de



dextrine/maltose peuvent être remplacées par de l'alcool de manière isocalorique (Guo et al., 2018).

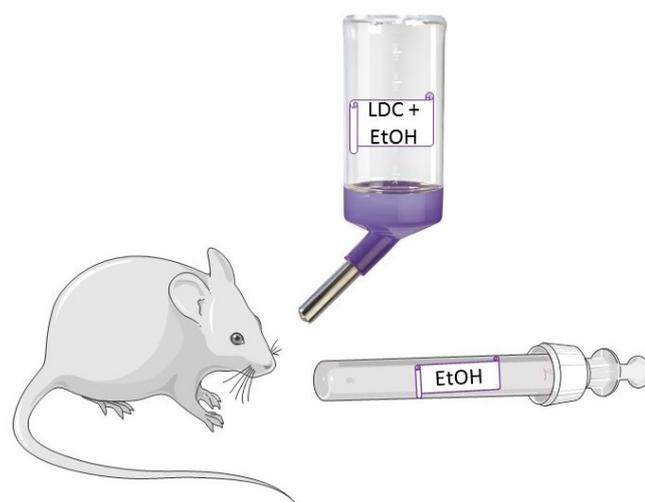
En pratique, l'exposition se fait de manière graduelle sur une période de 5 jours, afin d'habituer les animaux à ce régime liquide, tout en augmentant graduellement la quantité d'alcool contenue dans le mélange, passant de 0 à 50 g/L. Puis le LDC contenant 5% d'alcool est proposé pendant 4 à 12 semaines chez les souris (1-9 mois pour les rats) (Lamas-Paz et al., 2018).

Utilisé seul, le LDC ne permet donc pas d'étudier les formes avancées de MAF, malgré un temps d'exposition prolongé. Il semble donc nécessaire d'implémenter une seconde agression (théorie du « second hit ») par-dessus cette exposition chronique afin d'amplifier les atteintes hépatiques. Il peut s'agir d'exposer de manière aiguë à de l'alcool (voir paragraphe suivant sur le modèle chronique plus binge) ou d'autres agents chimiques comme le tétrachlorure de carbone (CCl₄) (Karaca et al., 2015) ou le diethylnitrosamine (DEN) (Rafacho et al., 2015). Il est aussi possible d'ajouter un élément de la physiopathologie de la MAF, le LPS (Muñoz et al., 2014), qui par-dessus un traitement chronique à l'alcool induit une SHA intensifiée, une infiltration hépatique, de la nécrose focale, une augmentation des transaminases et de l'activation des CEF avec des dépôts de collagènes péri-veineux (Karaa et al., 2008).

Chronique plus binge (Modèle du NIAAA)

Ce modèle présenté par l'équipe de Gao (Bertola et al., 2013) reprend les précédents travaux de Lieber tout en se rapprochant du schéma consommatoire retrouvé chez les patients souffrant de MAF : en plus d'une consommation chronique d'alcool, des épisodes de *binge drinking* produisent une augmentation de l'inflammation hépatique et causent des épisodes d'hépatites à l'origine même des processus de fibrose.

Initialement le modèle du NIAAA consistait en une exposition au LDC pendant 10 jours à 5% d'alcool, puis d'un unique épisode de *binge* à 5g/kg via gavage



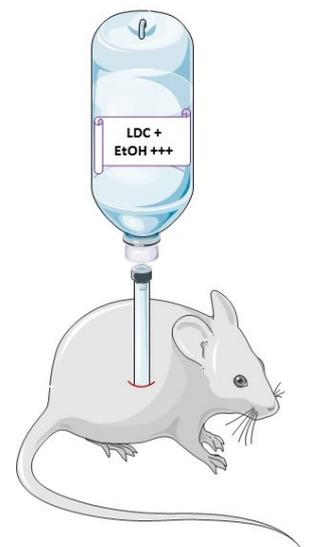
au 11^e jour, 9h avant l'euthanasie. Cela avait pour effet d'augmenter l'éthanolémie et d'avoir une atteinte hépatique aiguë, ainsi qu'une inflammation importante. Afin d'être encore plus ressemblant à ce que l'on trouve chez l'Homme, le *binge* par gavage peut être administré 2 fois par semaine durant la durée du protocole. Cela permet l'obtention d'éthanolémies pouvant atteindre 2-5 g/L, avec une élévation des transaminases et une stéatose sévère. Cependant cela s'accompagne aussi d'une augmentation de la mortalité (Lamas-Paz et al., 2018).

D'autres études ont remplacé le *binge* final par une série de 3 *binges* par gavage avec un intervalle de 12 heures entre chaque injection (Aroor et al., 2011). Dans cette étude les auteurs ont observé une forte augmentation de l'éthanolémie ainsi que des atteintes hépatiques et notamment du point de vue de l'infiltration des neutrophiles signe d'HA.

Modèle de Tsukamoto-French

Le modèle de Tsukamoto-French est le modèle d'étude de la MAF le plus poussé, à la fois d'un point de vue technique que d'un point de vue des atteintes hépatiques observées (Tsukamoto et al., 1984).

Il s'agit de d'implanter une canule intragastrique de manière chirurgicale afin d'exposer les animaux à de plus fortes doses d'alcool en court-circuitant le manque d'appétence des rongeurs pour l'alcool. Ainsi un régime alimentaire liquide leur est directement injecté au niveau gastrique, avec une quantité d'alcool pouvant représenter jusqu'à 49% des calories totales pendant une période de 30 jours (Tsukamoto et al., 1985). Dans cette étude les rats développaient une stéatose sévère avec une nécrose focale, des éthanolémies autour de 2 g/L et une élévation des transaminases.



Au cours du temps, Tsukamoto et ses collaborateurs ont mis à jour ce protocole en modifiant le contenu du régime alimentaire liquide. Ainsi en combinant le protocole original avec un régime alimentaire contenant 25% des calories sous forme de gras, une fibrose est observée

chez certains animaux après 30 jours d'exposition et chez tous les animaux après 120 jours (Tsukamoto et al., 1986). Chez la souris le traitement riche en graisse plus du fer carbonyle induit une fibrose à différents degrés de sévérité après 4 mois de traitement, avec 10% de cirrhose (Tsukamoto et al., 1995).

Cependant cette méthodologie présente de nombreuses limitations. On peut notamment citer le coût, le besoin de personnel formé à la chirurgie et au suivi post-chirurgical, la nécessité d'un suivi très important puisque la canule est maintenue pendant 2-3 mois en général (risque d'infections, d'irritations, ...), le régime riche en gras et enfin une forte mortalité.

Modèles de formes sévères d'hépatopathies

Outre la MAF, la modélisation animale est aussi utilisée pour l'étude d'autres formes de pathologies chroniques du foie. Dans ce cadre, plusieurs agents chimiques peuvent être utilisés afin d'induire des dommages hépatiques. Bien qu'utilisables seules, ces procédures peuvent aussi être appliquées en tant que « second hit » à la suite d'un régime LDC afin d'augmenter l'atteinte hépatique.

Le tétrachlorure de carbone (CCl₄)

Le tétrachlorure de carbone est un agent chimique utilisé afin de modéliser la fibrose hépatique (Yanguas et al., 2016). Sa toxicité est induite par son métabolite, le trichlorure de carbone (CCl₃), via le CYP2E1 (Wong et al., 1998). Lorsqu'il est utilisé en complément d'un régime LDC l'alcool induit une suractivité du CYP2E1 ce qui augmente la production de CCl₃ et potentialise ses effets : la peroxydation des lipides, la détérioration des structures membranaires, les anomalies de la production énergétique cellulaire et de la synthèse protéique (Weber et al., 2003).

Seul, le CCl₄ est injecté 2 fois par semaine par voie IP sur une période de 6 semaines, ou bien 3 fois par semaines durant 4 semaines, à la concentration de 0,5



à 0,7µL/kg (Yanguas et al., 2016). Si il est combiné à une exposition à de l'alcool, le LDC est proposé pendant 8 semaines, et durant les 4 dernières semaines une solution de 5% de CCl₄ est injecté à 2mL/kg par voie IP 2 fois par semaine (Nan et al., 2013).

Diethylnitrosamine (DEN)

Le diethylnitrosamine (DEN) est l'agent chimique de prédilection pour modéliser le CHC chez l'animal depuis l'établissement de ce modèle (Rajewsky et al., 1966). Le DEN est métabolisé au niveau hépatique par le cytochrome P450, ce qui induit une production de ROS et des dommages protéiques, lipidiques et de l'ADN conduisant à la mort des hépatocytes (Qi et al., 2008). Il est tout de même à noter que l'efficacité du DEN est souche-dépendante chez la souris (Buchmann et al., 1991) et que la souche C57BL y semble moins sensible alors que c'est la souche de prédilection pour le protocole de LDC due à son appétence naturelle pour l'alcool (Guo et al., 2018). Malgré tout, les 2 protocoles sont combinables comme l'ont démontré Ambade et ses collaborateurs (Ambade et al., 2016).

L'exposition seule au DEN est réalisé hebdomadairement par gavage de 100µL/kg chez la souris (Starkel and Leclercq, 2011). Lorsqu'il est combiné au régime LDC, le DEN est injecté par voie IP une fois par semaine à la dose de 75mg/kg pendant 3 semaines puis 100mg/kg pendant 3 autres semaines (Ambade et al., 2016).

Ainsi de nombreuses méthodologies expérimentales permettent d'étudier le développement de la MAF chez le rongeur. Cependant les expositions à de l'alcool seul, par voie oro-gastrique, ne sont pas suffisantes pour induire une forme avancée de MAF, peu importe le temps d'exposition. Afin d'obtenir un stade de fibrose ou des épisodes d'hépatites il semble donc nécessaire d'ajouter en complément des agents chimiques ou une alimentation riche en graisse qui vont dégrader le parenchyme hépatique. Il n'existe donc pas à l'heure actuelle de modèle de MAF avancée mais des modèles de troubles hépatiques mixtes combinant les effets métaboliques/toxiques à ceux de l'alcool.

Exposition aux vapeurs d'éthanol

Dans le cadre de notre travail de modélisation animale de la MAF, nous avons choisi d'utiliser une méthodologie différente de celles précédemment décrites. En effet, afin d'obtenir des lésions hépatiques significatives mais d'origine alcoolique uniquement, nous avons exposé nos souris à des vapeurs d'éthanol.

Cette méthodologie a été mise au point dans les années 1970 afin d'étudier le syndrome de sevrage chez les sujets alcoolo-dépendants (Goldstein and Judson, 1971). Il s'agit de l'un des seuls protocoles de modélisation de la dépendance chez le rongeur, capable d'induire des neuroadaptations persistantes, une motivation importante à consommer et des signes somatiques de sevrage (Gilpin et al., 2008).

Ce protocole a l'avantage d'exposer les animaux de manière passive à de fortes concentrations d'éthanol induisant ainsi des éthanolémies supérieures à 1,5 g/L sur des périodes de temps contrôlées (allant en général de 12 à 24 heures par jour, pendant plusieurs jours/semaines). Cela permet à la fois de standardiser l'exposition, de passer outre le manque d'appétence pour l'alcool des rongeurs et d'aplatir les différences de consommations interindividuelles (Mouton et al., 2016). Cependant, l'exposition étant pulmonaire, cette méthodologie ne permet pas d'obtenir les atteintes du système intestinal observées chez l'Homme ou les précédents modèles décrits. De plus l'exposition à des vapeurs d'alcool provoque une stabilisation de l'éthanolémie. Bien que celle-ci soit élevée, il est désormais connu que les pics d'éthanolémie observés lors d'épisode de type *binge drinking* sont un élément clé dans le développement de MAF (Ghosh Dastidar et al., 2018). Nous avons adressé ces limitations en ajoutant des injections (orales ou intrapéritonéales) de LPS et d'alcool, respectivement (voir chapitre deux).

Objectifs

Les formes avancées de la MAF et notamment le CHC présentent une morbi-mortalité importante. Cette dernière est la résultante d'un trouble de l'usage lié à l'alcool chronique non pris en charge, et notamment le développement d'hépatopathies non-décompensées passées sous silence.

La MAF est induite par la production excessive de ROS qui entraîne l'activation du système immunitaire ainsi que l'apparition d'un environnement inflammatoire. Le maintien d'une consommation chronique d'alcool amplifie cette réaction et tout en activant d'autres voies physiopathologiques (notamment la perméabilité intestinale) qui vont potentialiser la réponse immuno-inflammatoire.

Dans ce contexte, les miARNs nous apparaissent comme de parfaits candidats pour l'étude de nouveaux biomarqueurs associés à la MAF. En effet, via leur implication dans la régulation du système immunitaire (miR-122, -155, -223), dans les phénomènes pro-inflammatoires (miR-122, -155, -21, -34a*, -29a, -223) l'activation des voies pro-oncogènes (miR-155, -21, -34a*, -126*, -29a), ainsi que leur grande stabilité dans les liquides extracellulaires, les miARNs peuvent retranscrire les niveaux d'activation de certaines voies physiopathologiques de manière non-invasive. En l'absence de données cliniques suffisantes, les miARNs n'ont pas encore montré leur intérêt purement diagnostique dans la MAF et ne sont pas encore utilisés en pratique clinique.

L'objectif de cette thèse était d'évaluer l'intérêt clinique des miARNs circulants comme biomarqueurs de la MAF.

Pour cela, ce travail a pour objectifs de répondre à la question scientifique suivante : les miARNs sont-ils des biomarqueurs de suivi de la trajectoire de la MAF ?

Afin de répondre à cette question, les résultats de ce travail de thèse seront présentés en 3 parties :

- De la modélisation *in vitro* :

Nous avons exposé de manière chronique et quotidienne des cellules tumorales hépatiques de stade précoce et d'origine non-virale (les cellules Huh-7) à un milieu de culture contenant 0 ou 80mM d'éthanol. A l'aide de ce modèle nous avons pu étudier la présence de nos miARNs d'intérêt dans le surnageant des cellules, ainsi que les niveaux de miARNs intracellulaires et donc le ratio sécrétion/production de miARNs.

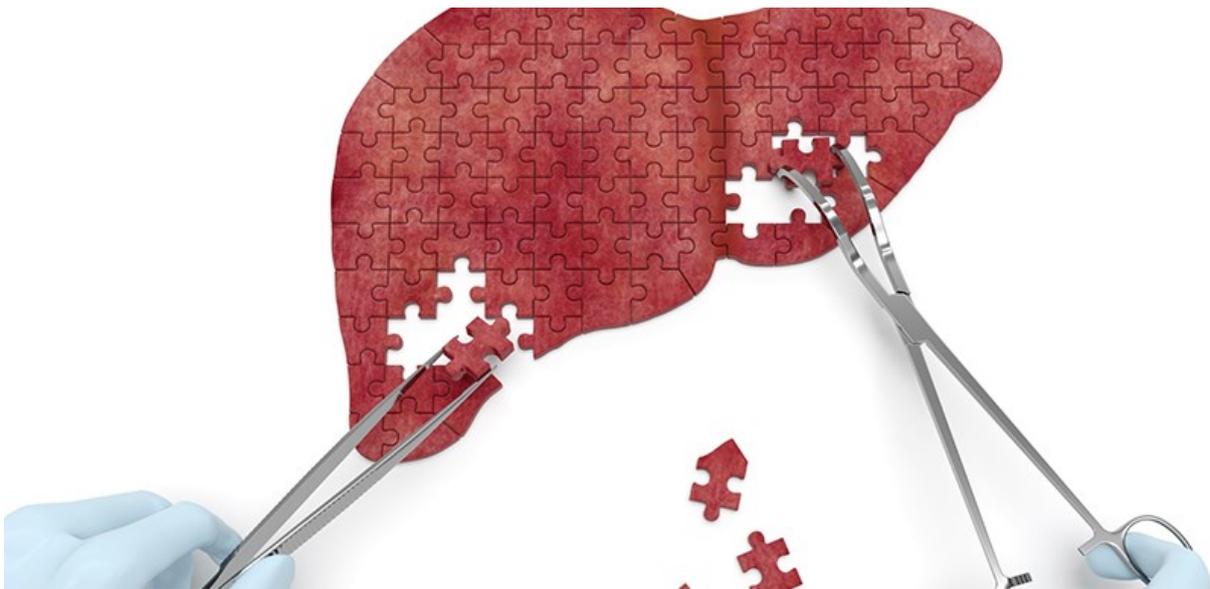
- De la modélisation *in vivo* :

Dans un modèle intégré d'exposition chronique à des vapeurs d'alcool chez des souris femelles non-consanguines de souche Swiss, nous nous sommes intéressés à la quantification de nos miARNs dans le plasma sanguin des souris exposées ou non à de l'alcool. Ce modèle nous permet aussi d'évaluer les taux de miARNs circulants en fonction d'une exposition à de l'alcool, mais aussi en fonction des atteintes hépatiques obtenues.

- Une étude clinique :

Enfin, nous avons quantifié les miARNs circulants à partir d'échantillons de sérum sanguin de sujets humains regroupés en 3 populations : des témoins sains sans hépatopathies ni TUA, des patients présentant une MAF sans CHC, et un groupe de patients présentant un CHC lié à l'alcool. Nous avons ainsi pu valider la présence de nos miARNs d'intérêt dans le sérum sanguin et évaluer leur intérêt dans le suivi de la trajectoire de la MAF jusqu'au CHC.

Chapitre Deux : Matériels et Méthodes



1. Modélisation Cellulaire

1.1 Culture cellulaire

Les données de culture cellulaires ont été réalisées à partir de cellules de la lignée Huh-7, des cellules dérivées d'un hépatome d'origine non-virale. Les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Life Technologies/Invitrogen, Saint Aubin, France) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (PAA, Velizy-Villacoublay, France), 2mM de L-Glutamine, 100 UI/mL de péniciline et 100 µg/mL de streptomycine (Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France).

Les cellules sont cultivées au sein d'un incubateur humidifié à la température de 37°C et avec un taux de CO₂ à 5%. Les cellules d'entretien sont conservées dans des flasques de 75cm³ en plastique dans laquelle les cellules Huh-7 peuvent adhérer en monocouche et proliférer au cours de la semaine. Ces cellules sont repiquées une fois par semaine lorsque celles-ci sont arrivées à confluence.

1.2 Exposition à l'alcool

Nous avons testé différentes modalités d'exposition à l'éthanol, que cela soit en termes de dosages (0 à 5%) ou de temporalités (24h à 11 mois).

Les résultats présentés dans ce manuscrit ont été obtenus à partir d'exposition quotidiennes à du DMEM contenant 0 ou 80 mM d'éthanol (96%, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) pendant une période de 8 mois. La concentration d'alcool dans le milieu était maintenue constante grâce à des ajouts journaliers de 25% de la quantité initiale d'éthanol. Cet ajout de volume d'éthanol permet de palier les pertes d'éthanol dans le milieu dues au métabolisme cellulaire et à l'évaporation.

Après plusieurs semaines d'expositions à ce protocole les cellules présentent des changements morphologiques. Les cellules contrôles, non-exposées à l'alcool maintiennent un fort contact entre elles. Les cellules sont compactées avec une morphologie cubique. Suite à l'exposition chronique à de l'alcool les cellules se détachent progressivement les unes des autres, avec une morphologie étoilée et de longs prolongements pour maintenir les contacts cellulaires (voir figure 19).

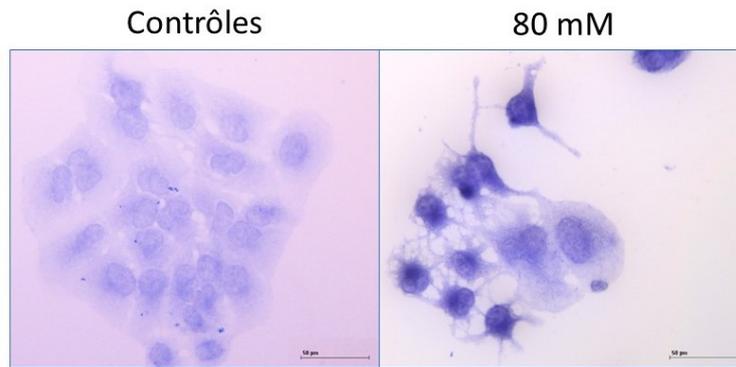


Figure 19 : *Changements morphologiques observées en imagerie optique chez des cellules exposées chroniquement à 0 ou 80mM d'éthanol. Les cellules contrôles (à gauche) ont été cultivées en parallèle des cellules exposées à 80mM d'éthanol. Les cellules contrôles apparaissent comme des cellules cubiques et compactent. Les cellules exposées chroniquement à l'alcool présentent des contacts intercellulaires ponctuels via de prolongements cytoplasmiques, ainsi qu'une morphologie étoilée et une tendance à s'isoler les unes des autres. On observe aussi quelques cellules en souffrance (ici un ballonnement cellulaire).*

Parallèlement, les cellules exposées chroniquement à de l'éthanol présentent des caractéristiques associées à la sévérité du CHC, telles qu'une augmentation significative de leur pouvoir migratoire, ou la présence de marqueurs de cellules souches cancéreuses à leur surface. Ces résultats ne seront pas décrits dans ce manuscrit mais nous permettent de valider la présence de phénotypes associés à la sévérité du CHC suite à l'exposition chronique à de l'éthanol chez des cellules de la lignée Huh-7.

1.3 Echantillonnage

Lors du repiquage hebdomadaire, une partie des cellules en surplus est transférée dans des flasques ou des plaques afin de réaliser divers tests. Dans le cas de l'étude de nos miARNs, les cellules étaient transférées dans des plaques 6 puits, à hauteur de 200 000 cellules par conditions puis laissées au repos pendant 24 heures afin que les cellules puissent adhérer au fond des plaques avant d'être réexposées à la dose d'éthanol correspondante (0 ou 80mM). Les cellules étaient cultivées durant 72 heures jusqu'à confluence, avant d'être récupérées

ainsi que leur surnageant. Pour ce faire, les cellules furent décollées grâce à une solution de Trypsine-EDTA, puis une numération cellulaire au Bleu Trypan à l'aide de cellules de Malassez permis de compter le nombre de cellules dans chaque condition, avant de mettre les cellules en culot sec et les stocker à -80°C jusqu'à l'extraction des miARNs.

2. Modélisation Animale

2.1 Animaux

Nous avons utilisé des souris de la souche SWISS âgées de 8 à 12 semaines (adultes) provenant du centre d'élevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Ces souris de souche non-consanguine ont été choisies pour leur hétérogénéité génétique. Nous avons travaillé chez des souris femelles, qui sont connues pour être plus sensibles que les mâles aux dommages hépatiques liés à l'alcool (Muller, 2006).

Les souris sont stabulées à raison de 10 animaux par cage en accord avec la réglementation en vigueur concernant le bien-être animal. Une période d'habituation de 7 jours après leur arrivée dans l'animalerie a été réalisée afin de stabiliser les groupes sociaux et réduire les comportements de stress inhérent au transport. La période d'habituation est réalisée dans les armoires de ventilations utilisées pour l'exposition des animaux à des vapeurs d'éthanol afin de réduire l'impact de cet environnement sur le début des expérimentations. Les conditions d'hébergement sont strictement contrôlées avec une température à $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, une humidité à $55\pm 10\%$ et un cycle jour/nuit de 12h/12h (jour entre 8h-20h). La présence d'enrichissements a été mise en place, avec une roue d'activité motrice, des tunnels en carton ou encore des éléments de nidation (igloo, litière foisonnante).

L'ensemble de nos expériences sont réalisées en accord avec la directive 86/609/EEC de la communauté européenne régissant l'expérimentation animale, et le CREMEAP (comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale de Picardie) (Référence Dossier : 2016063011175798). Les animaux étaient surveillés quotidiennement par un expérimentateur habilité durant la période d'habituation, et plus particulièrement durant la phase d'expérimentation. Chaque animal était pesé 2 fois par semaines (chaque lundi et



jeudi), et le change des cages réalisé toutes les 2 semaines afin de réduire au maximum le stress des animaux.

2.2 Protocole d'exposition à l'alcool

Les cages étaient placées dans une enceinte d'inhalation (voir photo ci-contre), afin de saturer au maximum le métabolisme hépatique de l'alcool et d'obtenir des expositions chroniques à l'alcool avec des éthanolémies stables et suffisantes (comprises entre 1,5-2,5 g/L). Dans ces armoires l'air délivré est chargé en vapeur d'éthanol par bullage d'air comprimé dans des réservoirs contenant de l'éthanol 96%. Les souris sont donc



soumises à un air chargé en éthanol (40 mg/L d'air) durant 18 heures par jour (et 6h d'air sans éthanol) sur une période de 36 jours – les 6 premiers jours correspondent à une période d'habituation où la durée d'exposition est graduellement augmentée afin de réduire au maximum la mortalité. En effet le maintien d'une éthanolémie élevée constante a pour effet de réduire la motricité des animaux, ce qui engendre une déshydratation et un arrêt de la prise alimentaire. Un sevrage de 6 heures en fin de soirée/début de nuit permet un temps de repos durant lequel les éthanolémies autorisent une reprise autonome de l'hydratation et de l'alimentation *ad libitum*.

La position de chaque cage est changée chaque jour afin de réduire toutes disparités liées à l'accumulation de vapeurs d'éthanol au niveau de l'embouchure de la sortie d'air.

En parallèle, les animaux ont reçu des traitements supplémentaires afin d'augmenter les processus de stress oxydatif et l'inflammation hépatique. Il s'agit d'injections intrapéritonéales d'alcool de manière poids-dépendant à hauteur de 4g/kg tous les 3 jours, après leurs séances de 18h d'inhalation afin que leur période de récupération se fasse durant les périodes sans vapeurs d'éthanol.

De plus, des injections par gavage de 10mg/kg de LPS issu d'une souche d'*Escherichia coli* (E.Coli O111:B4, Sigma-Aldrich) étaient réalisées de manière hebdomadaire afin de majorer le processus de translocation intestinale.

2.3 Prélèvements

Après 36 jours d'exposition intermittente à l'alcool, les animaux étaient euthanasiés en accord avec le projet APAFIS 2016063011175798. Ainsi, afin d'optimiser le recueil du volume sanguin maximal et des organes d'intérêt (le foie et le cerveau) sans altérer les prélèvements, la mise à mort a été réalisée par un expérimentateur habilité.

Dès les prélèvements effectués, ceux-ci sont gardés dans la glace en attendant leur transfert dans une enceinte à -20°C. Les prélèvements sanguins étaient réalisés dans des tubes héparinés et centrifugés immédiatement grâce à une centrifugeuse de paillasse pendant approximativement 10 minutes. Une dernière centrifugation à 11 000G pendant 5 minutes était ensuite réalisée afin de récupérer le plasma sanguin. Les échantillons de plasma étaient ensuite stockés à -20°C en attendant l'extraction.

3. Echantillons Humains

3.1 Patients

Les échantillons de sérum utilisés dans ce travail de thèse ont été traités et stockés par le Centre de Ressources Biologiques du CHU d'Amiens-Picardie. Un total de 165 patients ont été recrutés pour cette étude afin de constituer 3 groupes : des patients sans hépatopathies ni TUA (n=49), des patients atteints de MAF sans CHC (n=71) et des patients atteints de CHC lié à l'alcool (n=45).

3.2 Echantillons

Les échantillons reçus de la Biobanque de Picardie étaient sous forme de paillettes de 400µL de sérum. Chacun des échantillons a reçu un code d'anonymat à son arrivée dans le laboratoire. Le travail d'extraction, quantification et d'analyse a ainsi été réalisé en aveugle.

4. Extraction et quantification des miARNs

Extractions des miARNs

L'extraction des miARNs dans nos différents échantillons a été réalisée de manière automatisée en utilisant l'extracteur d'acide nucléique Maxwell RSC (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) équipé du kit d'extraction *Maxwell® RSC miRNA Tissue Kit* (AS1460).

Ce kit automatisé permet une extraction des miARNs à partir de 200µL de sérum/surnageant cellulaire ou bien à partir d'un culot cellulaire en suspension dans 200µL de solution d'homogénéisation. Cette suspension est ensuite mise en présence de 200µL de solution de lyse, de protéinase K et de Cel-miR-39. La solution de lyse apporte un milieu hypertonique et la protéinase K permet de désorganiser les membranes cellulaires. La lyse des cellules et des vésicules contenant des miARNs constitue le lysat dont seront extraits les miARNs à doser par RTqPCR. Le Cel-miR-39 est un miARN produit spécifiquement par le ver *Caenorhabditis elegans* (donc ni par l'Homme ni les rongeurs). Ce miARN introduit en quantité connue dans chaque échantillon nous sert ainsi de contrôle interne afin de valider le bon fonctionnement du protocole d'extraction automatisée puis de réaliser une quantification de nos miARNs d'intérêt lors de la PCR quantitative.

RTqPCR

Après l'étape d'extraction des miARNs, ceux-ci sont rétrotranscrits en ADN complémentaire en suivant le protocole du kit TaqMan correspondant (ThermoFisher Scientific). Pour se faire nous avons mis en présence lors de chaque RT-PCR:

- 5 μL d'éluat issue de l'extraction
- 1,5 μL de sondes 5X spécifiques pour le Cel-miR-39
- 1,5 μL de sondes 5X spécifique du miARN d'intérêt
- 0,15 μL de dNTPs
- 0,19 μL d'inhibiteur de RNase
- 1,5 μL de solution tampon
- 1,5 μL d'enzymes de rétro-transcription
- 4,16 μL d'eau sans RNases ni DNases

Chacun de ces mélanges sont placés dans un thermocycleur (Mastercycler gradient, Eppendorf) pour un protocole de 65 minutes découpé en 3 phases : 30 minutes à 16°C, 30 minutes à 42°C et 5 minutes à 85°C avant d'être refroidi à 4°C dans l'attente de la PCR (à -20°C si celle-ci n'est pas réalisée immédiatement).

Une fois l'ADN complémentaire produit celui-ci est quantifié par PCR quantitative (StepOnePlus, Applied Biosystems) en utilisant la technologie TaqMan. Cette réaction en chaîne par polymérase est réalisée dans des plaques 96 puits (Starlab), et chaque échantillon analysé en duplicata à la fois pour le Cel-miR-39 et chaque miARN d'intérêt.

Pour chaque puit le mélange suivant est réalisé :

- 5 μL de master mix
- 3,5 μL d'eau sans RNases ni DNases
- 0,5 μL de sondes 20X spécifique au miARN (Cel-miR-39 ou miARN d'intérêt)
- 1 μL d'échantillon

5. Analyses statistiques

Nous avons utilisé le logiciel SigmaPlot 11.0 (LogiLabo, Paris, France). Dans le cadre de nos comparaisons entre 2 groupes les analyses statistiques de nos données ont été faites par test t de Student, avec un *Mann-Whitney Rank Sum Test* en post-hoc si nécessaire. Lors de comparaisons entre 3 groupes, une analyse de variance à 1 voie (ANOVA 1 voie) a été réalisée, suivi du test de Tukey en *post-hoc*, ou de la méthode Holm-Sidak. Une analyse de la courbe ROC (receiver operating characteristic) et de l'air sous la courbe (AUROC) ont été réalisées afin d'étudier l'intérêt de chaque miARN dans le repérage des cas de CHC. Enfin un test de Chi-deux nous a permis d'évaluer l'efficacité de combinaisons de miARNs comme indicateurs potentiels de CHC en se servant des données extraites des analyses de courbes ROC. Le seuil de significativité est établi à $p < 0,05$.

Chapitre Trois : Résultats

1. Modélisation Cellulaire

1.1 Production de miARN intracellulaire

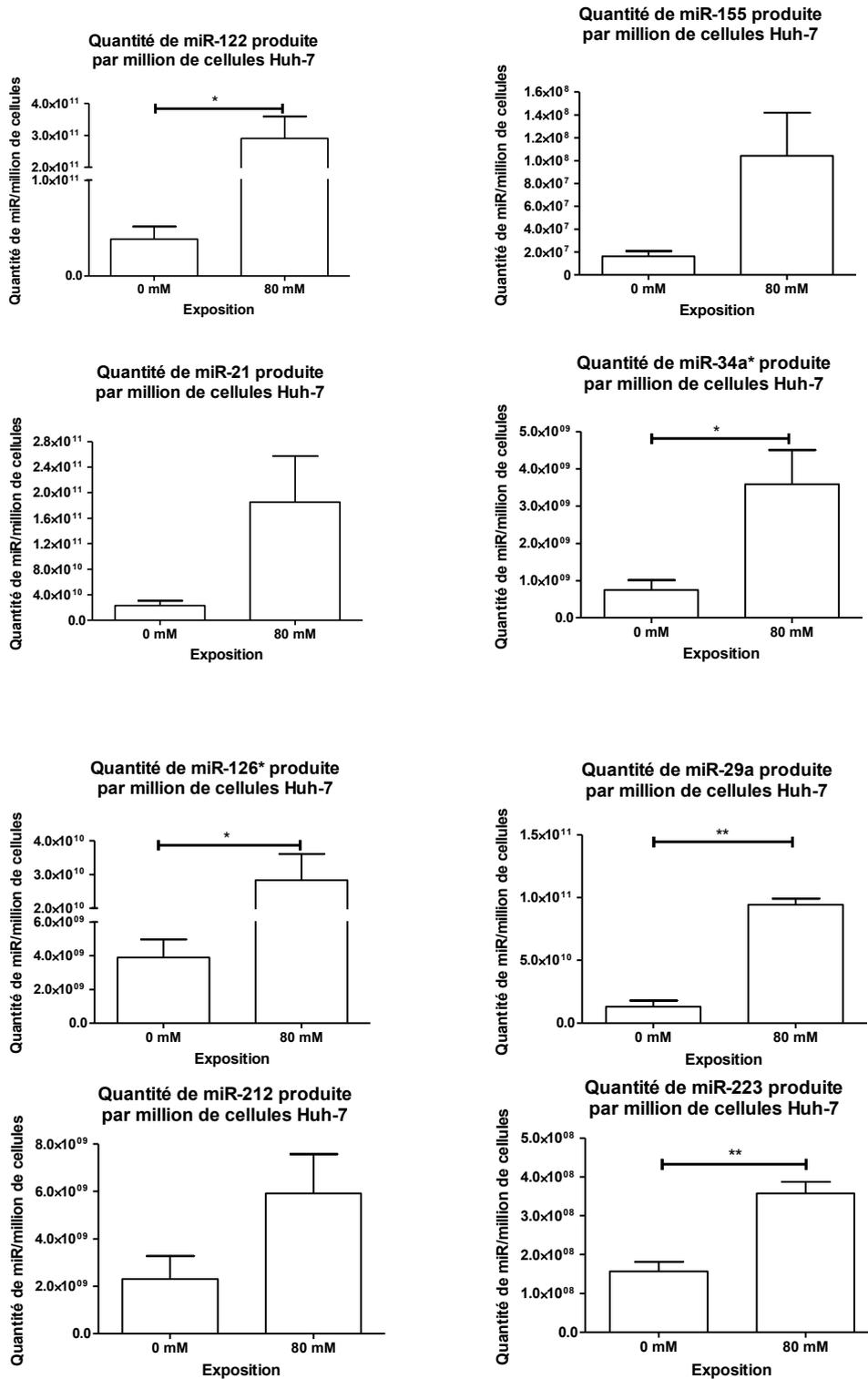


Figure 20 : Mesures des quantités de miARNs produites par million de cellules Huh-7 exposées chroniquement à 0 ou 80mM d'éthanol.

Après 6 mois d'exposition chronique à de l'alcool nous observons une **augmentation des quantités intracellulaires pour chacun des miARNs mesurés**. Ces résultats sont récapitulés dans le tableau suivant :

<i>miARNs</i>	<i>Nombre de copies</i>		<i>Variations</i>	<i>Statistiques</i>	
	<i>0 mM</i>	<i>80mM</i>		<i>p</i>	<i>T</i>
<i>miR-122</i>	$3,8.10^{10}$	$2,9.10^{11}$	760%	0,022	-3 629
<i>miR-155</i>	$1,6.10^7$	$1,0.10^8$	625%	0,10	MWRST
<i>miR-21</i>	$2,3.10^{10}$	$1,9.10^{11}$	826%	0,10	MWRST
<i>miR-34a*</i>	$7,5.10^8$	$3,6.10^9$	480%	0,041	-2 965
<i>miR-126*</i>	$3,9.10^9$	$2,8.10^{10}$	718%	0,036	-3 097
<i>miR-29a</i>	$1,3.10^{10}$	$9,5.10^{10}$	730%	0,001	-11 489
<i>miR-212</i>	$2,3.10^9$	$5,9.10^9$	257%	0,132	-1 892
<i>miR-223</i>	$1,6.10^8$	$3,6.10^8$	225%	0,006	-5 237

Tableau 01 : Récapitulatif des quantifications de miARNs intracellulaires comprenant le nombre de copies quantifié chez les cellules contrôles et les cellules exposées à 80mM d'éthanol, la variation en pourcentage du nombre de copie mesuré chez les cellules exposées à l'éthanol ainsi que l'analyse statistique. MWRST = Mann-Whitney Rank Sum Test.

Au total nos résultats montrent une augmentation de l'expression de chacun de nos miARNs d'intérêt suite à une exposition chronique à 80mM d'éthanol chez des cellules Huh-7.

1.2 Libération de miARNs dans le surnageant de cultures cellulaires

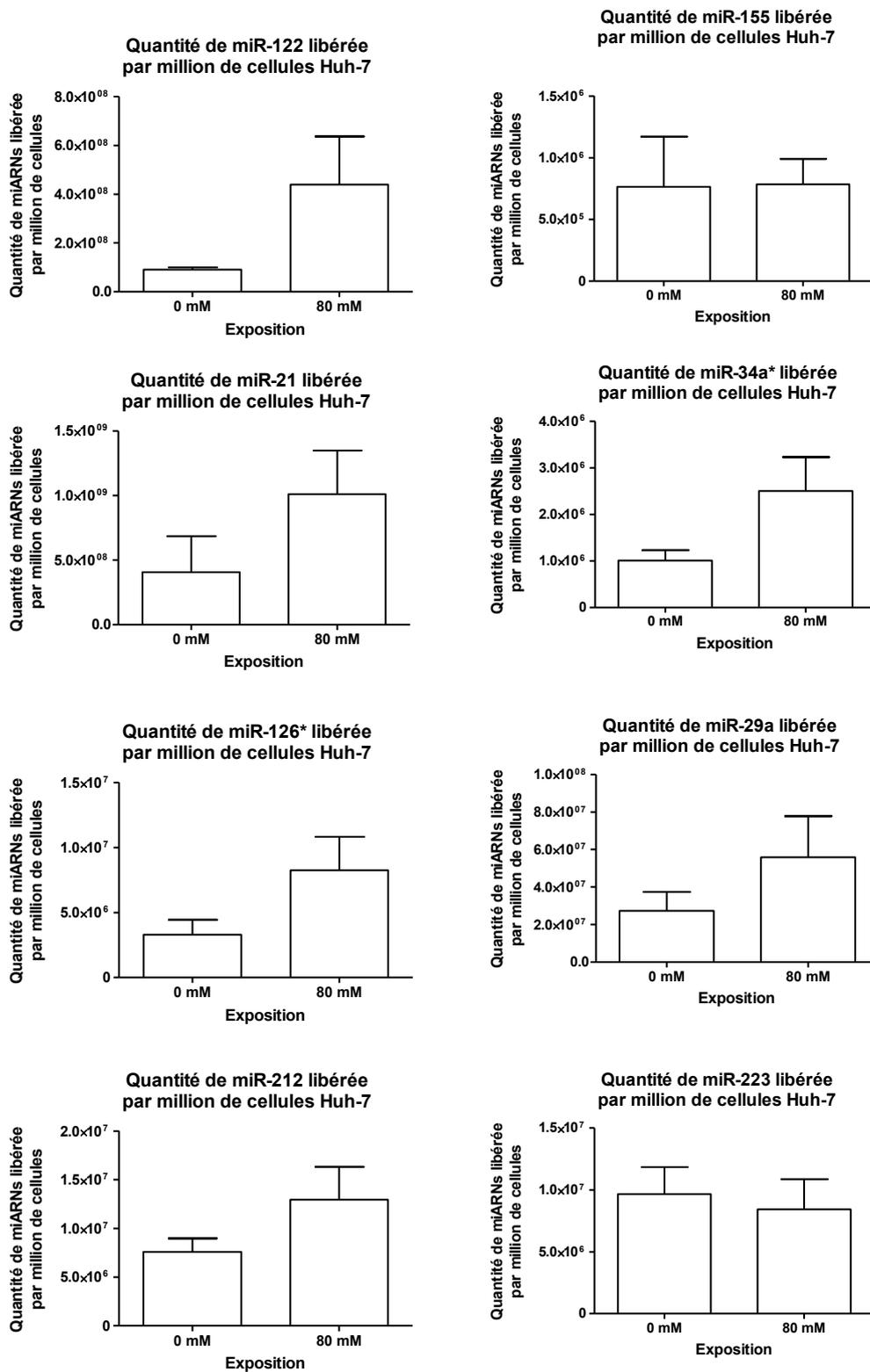


Figure 21 : Mesures des quantités de miARNs excrétées par million de cellules Huh-7 exposées chroniquement à 0 ou 80mM d'éthanol.

Après 6 mois d'exposition chronique à de l'alcool nous n'observons pas de différence statistiquement significative dans le nombre de copies de miARNs excrétés dans le surnageant. Ces résultats sont récapitulés dans le tableau suivant :

miARNs	Nombre de copies		Variations	Ratio Extra/Intracell		Statistiques	
	0 mM	80mM		0 mM	80 mM	p	T
miR-122	$9,0.10^7$	$4,4.10^8$	489%	0,24%	0,15%	0,152	-1 766
miR-155	$7,6.10^5$	$7,8.10^5$	103%	4,75%	0,78%	0,968	-430
miR-21	$4,1.10^8$	$1,0.10^9$	244%	1,78%	0,53%	0,240	-1 379
miR-34a*	$1,0.10^6$	$2,5.10^6$	250%	0,13%	0,07%	0,123	-1 948
miR-126*	$3,3.10^6$	$8,2.10^6$	248%	0,08%	0,03%	0,155	-1 751
miR-29a	$2,7.10^7$	$5,6.10^7$	207%	0,21%	0,06%	0,264	-1 371
miR-212	$7,6.10^6$	$1,3.10^7$	171%	0,33%	0,22%	0,215	-1 471
miR-223	$9,7.10^6$	$8,4.10^6$	87%	6,06%	2,33%	0,727	374

Tableau 02 : Récapitulatif des quantifications de miARNs extracellulaires comprenant le nombre de copies quantifié chez les cellules contrôles et les cellules exposées à 80mM d'éthanol, la variation en pourcentage du nombre de copie mesuré chez les cellules exposées à l'éthanol ainsi que l'analyse statistique et le ratio entre les miARNs extracellulaires/miARNs intracellulaires pour chaque condition.

Au total nos résultats ne montrent pas de modification statistiquement significative du taux de sécrétion de nos miARNs d'intérêt suite à une exposition chronique à l'alcool.

2. Modélisation Animale

2.1 Timeline

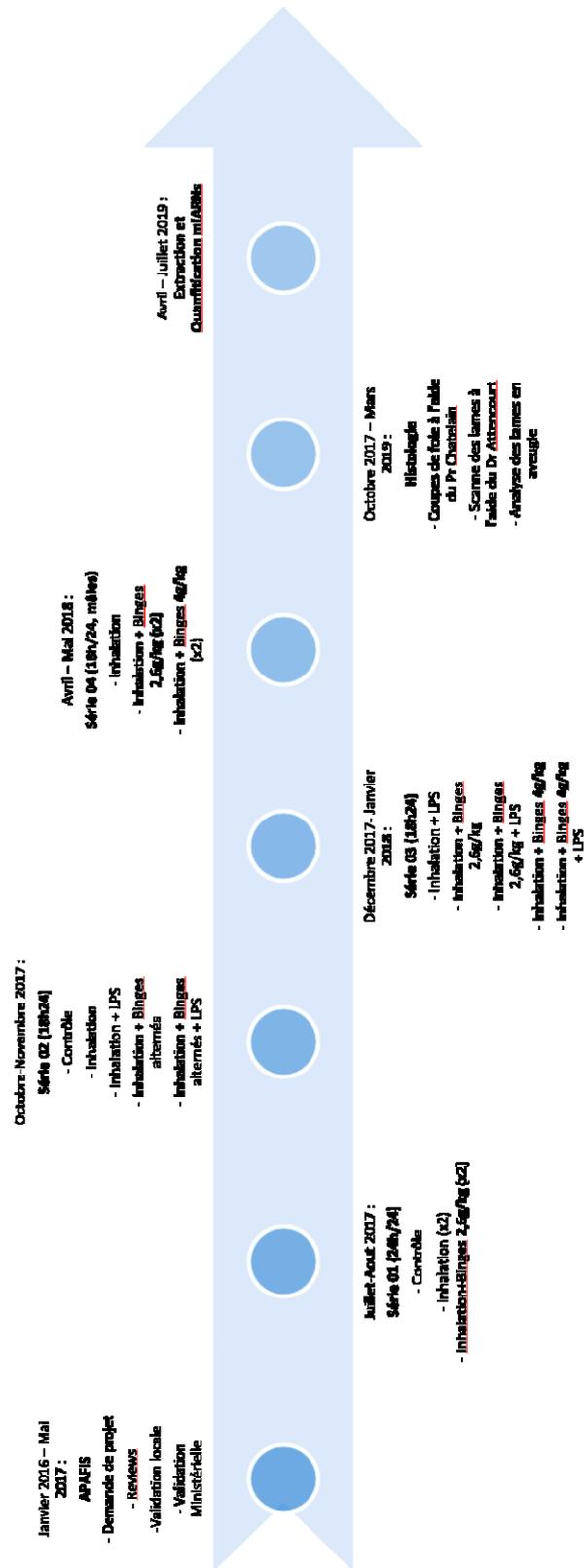


Figure 22 : Frise chronologique correspondant à l'expérimentation animale.

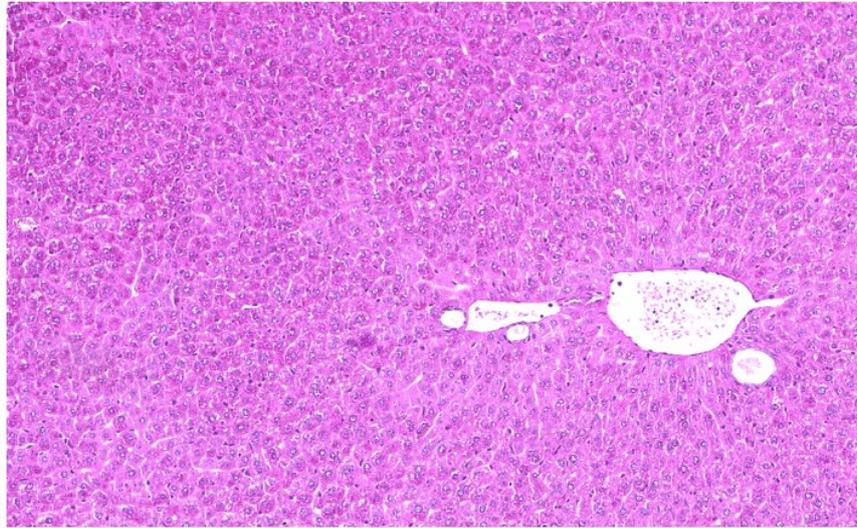
Ce projet de modélisation animale mis au point durant mes stages de master au sein du GRAP a nécessité une refonte du projet suite à l'application du décret n°2013-118 de février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, ainsi qu'au déménagement du laboratoire et notamment de l'animalerie dans de nouveaux locaux.

Après plusieurs allers-retours au niveau local et de nombreux délais dans le traitement de notre demande d'autorisation d'expérimentation animale, nous avons reçu l'accord ministériel en mai 2017. Nous avons ensuite réalisé plusieurs séries d'expérimentation afin d'optimiser notre procédure expérimentale entre juillet 2017 et mai 2018, avant de réaliser l'analyse histologique avec l'aide du Pr Chatelain et du Dr Attencourt (CHU Amiens-Picardie, service d'anatomopathologie). Enfin nous avons réalisé l'extraction et la quantification des miARNs à partir du plasma sanguin obtenu.

Les résultats concernant la modélisation animale présentés dans ce travail de thèse correspondent à un protocole d'exposition aux vapeurs d'éthanol, à des injections d'éthanol intrapéritonéales et à une exposition au LPS. Cette méthodologie correspond au meilleur compromis entre une exposition chronique à l'alcool stable et significatif de manière chronique permettant l'obtention d'atteintes hépatiques, tout en limitant au maximum la mortalité observée afin d'obtenir des données suffisantes et analysables.

2.2 Aspect Histologique

Souris témoins



Souris exposées

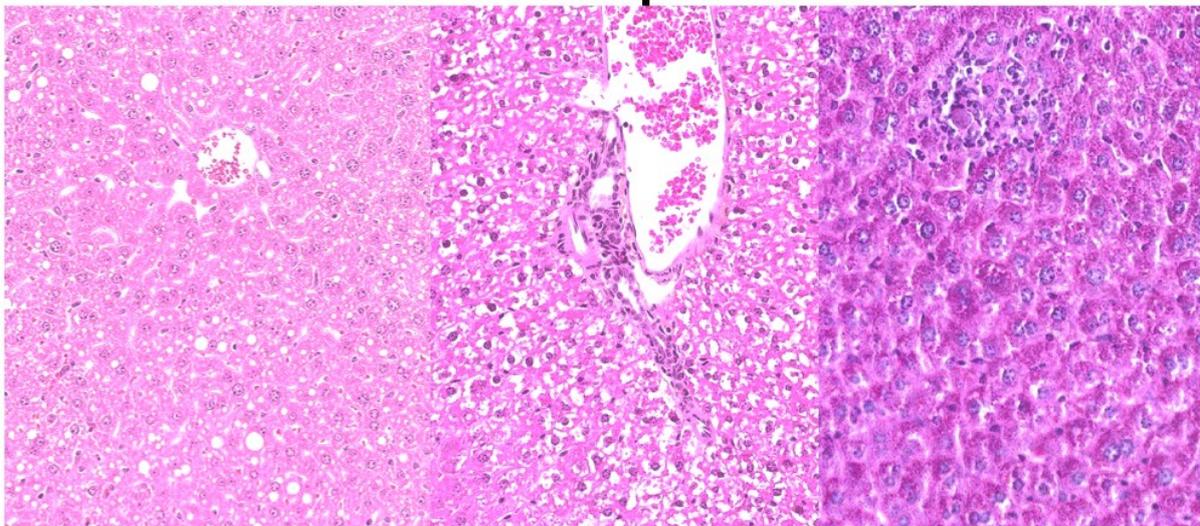


Figure 23 : Coupes histologiques de foies de souris contrôles exposées ou non à l'alcool. Comparativement aux coupes de foie d'animaux contrôles, nous observons l'apparition de vacuole de stéatose (gauche), de l'infiltration de polynucléaires neutrophiles dans l'espace porte (centre) et des foyers ponctuels d'hépatite à distance de l'espace porte (droite) sur les coupes de foies d'animaux exposés chroniquement à de l'alcool.

Lors de nos premières observations histologiques, nous avons observé de la stéatose dans 35% des foies de souris exposées à de l'alcool, ainsi que des infiltrations de polynucléaires neutrophiles (29%) avec ponctuellement des hépatites focales.

2.2 Courbe de Survie

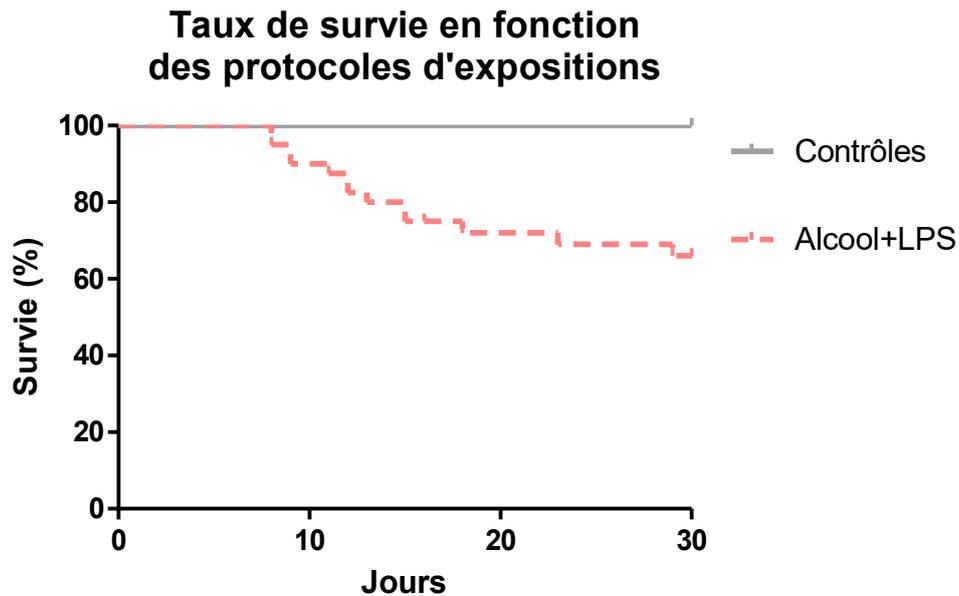


Figure 24 : Courbe de survie représentant la mortalité induite par le protocole d'exposition à l'alcool et au LPS comparativement aux souris exposées à de l'air sans alcool.

L'exposition aux vapeurs d'éthanol pendant 18h/24 pendant plusieurs jours entraîne un état de déshydratation et une réduction de l'activité motrice des animaux qui peut être potentialisée par une injection IP d'éthanol ainsi que le gavage de LPS.

Malgré une surveillance accrue et l'injection d'une solution saline contenant 5% de glucose en cas de signes d'inconfort, nous observons un taux de mortalité de 34% chez les souris exposées à notre protocole d'alcoolisation.

Les souris contrôles mise dans les chambres d'inhalation sans éthanol ne présentent aucun signe d'inconfort ni de mortalité prématurée.

2.3 Quantification de miARNs circulants

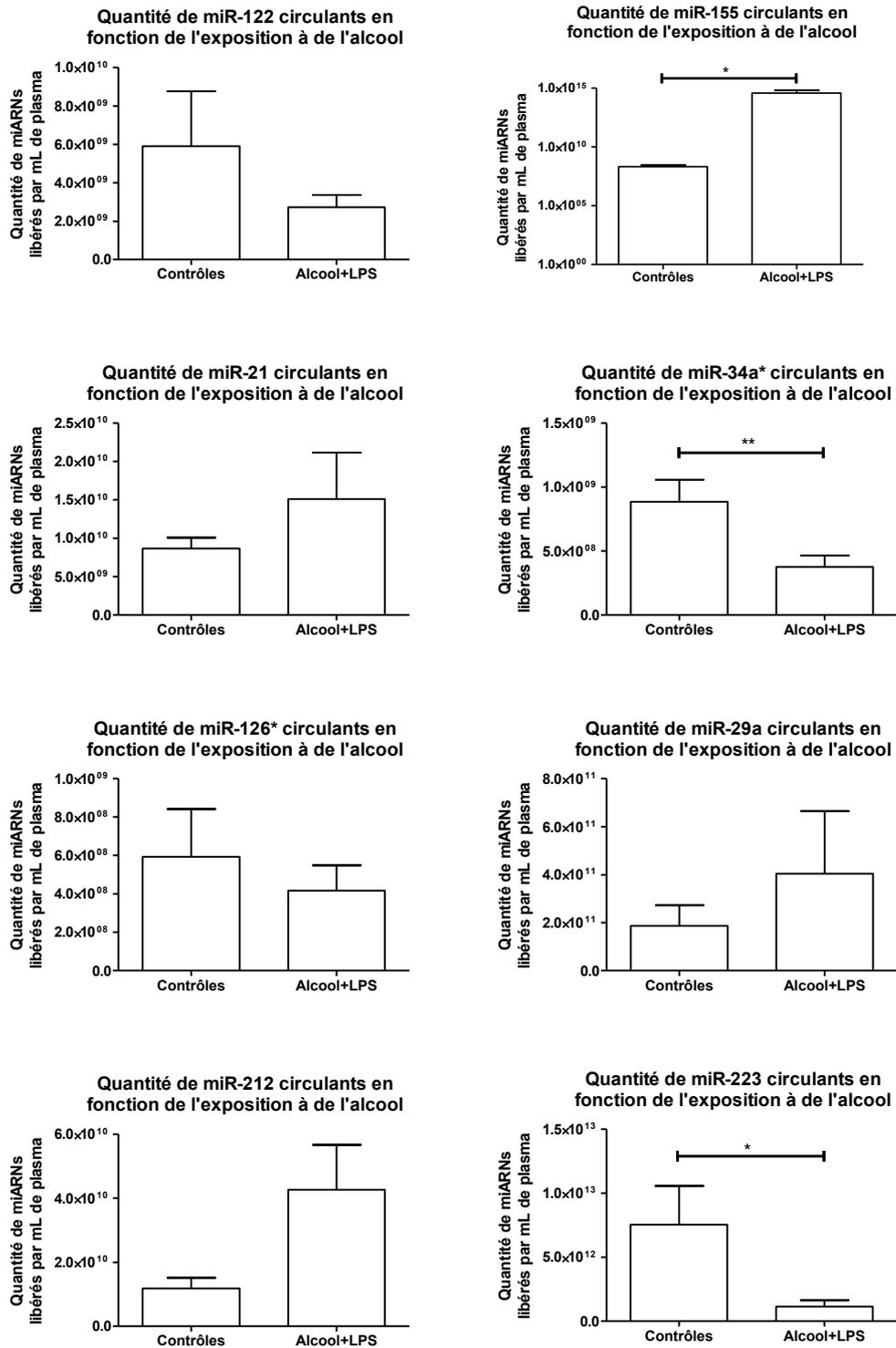


Figure 25 : Quantités de miARNs circulants par mL de plasma sanguin chez les souris exposées à de l'alcool comparées à celle de plasma sanguin issu de souris contrôles non-exposées.

Suite au protocole d'alcoolisation nous observons **3 variations statistiquement significatives** des miARNs d'intérêt dans le plasma sanguin des souris exposées à l'alcool : **l'augmentation du miR-155 et la réduction du nombre de miR-34a* et de miR-223**. Les autres comparaisons ne sont pas statistiquement significatives. Ces résultats sont récapitulés dans le tableau suivant :

<i>miARNs</i>	<i>Nombre de copies</i>		<i>Variations</i>	<i>Statistiques</i>	
	<i>Contrôles</i>	<i>Alcool+LPS</i>		<i>p</i>	<i>t/U</i>
<i>miR-122</i>	$5,9.10^9$	$2,7.10^9$	46%	0,512	-
<i>miR-155</i>	$2,1.10^8$	$3,7.10^{14}$	$1,7.10^8\%$	0,039	<i>U = 9 000</i>
<i>miR-21</i>	$8,7.10^9$	$1,5.10^{10}$	172%	0,479	-
<i>miR-34a*</i>	$8,8.10^8$	$3,8.10^8$	43%	0,008	<i>t = 2 917</i>
<i>miR-126*</i>	$5,9.10^8$	$4,2.10^8$	71%	0,852	-
<i>miR-29a</i>	$1,9.10^{11}$	$4,0.10^{11}$	211%	0,890	-
<i>miR-212</i>	$1,2.10^{10}$	$4,0.10^{10}$	333%	0,066	<i>U = 31 000</i>
<i>miR-223</i>	$7,5.10^{12}$	$1,2.10^{12}$	16%	0,017	<i>U = 23 000</i>

Tableau 03 : Récapitulatif des quantifications de miARNs dans le plasma sanguin de souris, comprenant le nombre de copies quantifié chez les souris contrôles et les souris exposées à l'alcool+LPS, la variation en pourcentage du nombre de copie mesuré chez les souris exposées à l'éthanol ainsi que l'analyse statistique.

3. Résultats Humains

Article : Circulating micro-RNAs as biomarkers of alcohol-related liver disease and hepatocellular carcinoma

Charles-Antoine Papillon, Romain Buttolo, Mickaël Naassila, Eric Nguyen-Khac, Hakim Houchi

La MAF est une pathologie chronique qui se développe après des années de consommation d'alcool et qui tend à s'aggraver avec le maintien d'un tel schéma consommatoire. En Europe et plus particulièrement en France, la MAF représente la cause majoritaire de troubles hépatiques chroniques. Or les patients atteints de formes sévères de MAF ont tendance à être plus jeunes que ceux ayant une pathologie virale ou métabolique, cela est dû à une progression plus rapide de la pathologie d'origine alcoolique. De plus, la MAF s'avère généralement silencieuse d'un point de vue clinique jusqu'à atteindre les formes les plus sévères de la pathologie (cirrhose ou CHC). Ces différents facteurs expliquent en partie le taux de mortalité important des formes sévères de MAF. D'où la nécessité de nouveaux marqueurs de l'évolution de cette pathologie permettant une intervention à un stade précoce.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés aux microARNs circulants comme potentiels biomarqueurs du suivi de la MAF car il s'agit d'éléments très stables dans la circulation sanguine, avec un rôle clé dans la communication intercellulaires et la régulation des voies physiopathologiques telles que l'inflammation, l'activation du système immunitaire ou encore la carcinogénèse. Nous avons ainsi sélectionné 5 miARNs dans la littérature pour leurs implications dans la MAF et le CHC lié à l'alcool. Nous avons quantifié ces miARNs dans le sérum de 165 patients (49 témoins sans hépatopathies, 71 patients souffrant de MAF sans CHC et 45 patients atteints de CHC d'origine alcoolique). Nos résultats démontrent que chacun de ces miARNs est associé significativement à la MAF. De plus les miR-122 et miR-155 semblent particulièrement associés au CHC lié à l'alcool.

Ces résultats soulignent l'intérêt des miARNs comme biomarqueurs de suivi de la pathologie. Les miR-122 et miR-155 apparaissent particulièrement intéressants dans le cas du suivi de patients souffrant de formes non-cancéreuses de MAF car ils seraient associés à l'hépatocarcinogénèse. Associés à d'autres miARNs circulants comme le miR-21 et miR-34a*,

des profils de miARNs spécifiques de la pathologie pourraient permettre une prise en charge précoce du CHC et donc améliorer le taux de survie de ceux-ci.

Circulating micro-ARNs as biomarkers of alcohol-related liver disease and hepatocellular carcinoma

Papillon C-A¹, Buttolo R¹, Naassila M¹, Nguyen-Khac E^{1,2}, Houchi H^{1*}

* Corresponding author, Dr Hakim Houchi, University of Picardie Jules Verne, Chemin du Thil, Research Group on Alcohol and Pharmacodependences (GRAP), INSERM U1247, Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), 80025 Amiens cedex 1 – Hakim.Houchi@u-picardie.fr

1 - Research Group on Alcohol & Pharmacodependences (GRAP), INSERM UMR1247, Université de Picardie Jules Verne, Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), Amiens, France

2 - Hepato-gastroenterology department, CHU Amiens-Picardie, Amiens, France

Running title: micro-RNA and alcohol-related liver disease

Keywords: alcohol-related liver disease, hepatocellular carcinoma, biomarkers, microRNA

ABSTRACT

Introduction: In Europe, 60-80% of liver deaths are due to alcohol abuse, as it is well known that alcohol-related liver disease (ALD), notably ALD-related hepatocellular carcinoma (HCC), has a worse outcome than any other etiology of liver disease (HCV, non-alcoholic fatty liver disease,...). In this study, we propose to evaluate the interest of using a combination of candidate micro-RNAs (miRNA) as potential diagnostic biomarkers of HCC related to ALD-cirrhosis. Indeed, the current non-invasive markers used for HCC diagnostic have a poor sensitivity, which could be improved by the use of miRNAs. We have selected 4 circulating miRNAs for their implication in hepatic physiology (miR-122) and liver carcinogenesis (miR-155, miR-21, miR-34a and miR-126*).

Method: We have recruited 165 patients for 3 groups: HCC due to ALD, ALD without HCC and a control group without liver disease neither alcohol abuse habits. MicroRNAs were then extracted from blood serum and quantified using TaqMan Technology.

Results: Compared to controls, we observed in ALD patients' bloodstream an increase of the number of copies of miR-122, miR-155, miR-21, miR-34a and miR-126* (of 3-fold, 46-fold, 12-fold, 24-fold and 10-fold, respectively). In HCC patients compared to controls, we also found an increased levels of all miRNAs (of 7-fold, 1133-fold, 12-fold, 28-fold and 12-fold, respectively). Moreover, the miR-122 and miR-155 levels were significantly higher in HCC patients than in ALD patients without HCC. We calculated different cut-off values corresponding to the number of copies of these miRNAs that allow us to distinguish the HCC patients from ALD cases.

Conclusion: We propose the miR-122 and miR-155 as potential biomarkers for the early diagnostic of HCC. These miRNAs could be used in combination with the miR-21 and miR-34a for the follow-up of ALD patients.

INTRODUCTION

In Europe, 60-80% of liver death are due to alcohol-related liver disease (ALD) (1). These deaths are partly caused by the hepatocellular carcinoma (HCC). According to the Milan criteria, advanced HCC in patients who do not benefit from a liver transplantation, suffer of a dramatic 5-year mortality rate (95.1%) (2).

HCC is the 7th cancer worldwide in incidence and the 3rd in mortality (3). The high mortality rate can partially be explained by a lack of early clinical symptoms and of non-invasive reliable markers(4), leading to a late diagnostic and to fewer therapeutic options. Especially in patients with alcohol-related HCC where displaying younger age and more rapid tumor growth (5). The current non-invasive markers used for HCC diagnostic, as α -fetoprotein (AFP), have poor sensitivity and high false-negative levels (6). The lack of sensitivity and of positive predictive value (PPV) of AFP is due to a correlation between the tumor size and AFP levels (7). Thirty-one percent of advanced HCC have AFP levels under 10ng/mL and some patients, even at the latest stage of pathology, are still AFP-negative due to the absence of AFP in the peripheral circulation (8,9).

Over the recent years, a lot of interest has been accorded to miRNAs in cancerogenesis and their usefulness as potential biomarkers. MicroRNAs are small noncoding RNAs of approximately 22 nucleotides with a key role in post-transcriptional regulation. MicroRNAs bindings have been described to interact on the turn-over and the translational processes of mRNAs (10). Hundreds pathways could be regulated using only one miRNA (11) and almost 2,600 have been identified in Humans (www.mirbase.org). MicroRNAs dysregulations have been already reported in a large amount of human diseases (12–14). They also present all the characteristics needed to be useful biomarkers (15): they are measurable, have a role in physiopathology, and are easily available in all body fluids, with

an average half-life of 119 hours in extracellular fluids as urine, saliva or blood serum/plasma (16).

Several studies focused on viral etiologies as HBV (17–19) and HCV (19–22) reported miRNAs dysregulations in HCC tumor in comparison to peritumoral areas or in blood (19,22). The HCC is closely related to the worse outcome of chronic alcohol consumption and thus alcohol is the 2nd risk factor of HCC (23). The purpose of our study was to evaluate the benefit of using miRNAs as biomarkers for the follow-up of ALD.

Regarding recent reports, we chose a candidate miRNAs strategy by selecting 5 miRNAs from HCC literature: miR-122, miR-155, miR-21, miR-34a* and miR-126*. miR-122 is liver-specific and represents approximately 72% of all liver-produced miRNAs (24). It has been extensively studied in liver disease, particularly in HCC association studies (21,25–27) but not in the specific alcohol-related etiology. In ALD, miR-122 is supposed to induce intestinal permeability which allow LPS translocation (28) and then monocyte sensitization to LPS (29). MicroRNA-155 was initially found to be linked to the immune function (30) and identified as an oncomiR (31). Its production has been found to be increased in liver cancer cases with a correlation between miR-155 levels and liver disease (32–35). In 2006, miR-21 was the only miRNA found to be upregulated in the 6 more frequent solid tumors (31) and was since then described as an oncomiR and a metastamiR (36,37). Its production and its circulating levels are both increased during liver carcinogenesis (27,37–40). Micro-RNA-21 appears to be linked to triglyceride accumulation and inflammatory process during ALD (41–43). microRNA-126* and miR-126 are positively correlated in HCC tissue (44). MicroRNA-126 displayed an inhibition of cell proliferation and induced apoptosis (45,46). MicroRNA-126* has been linked to alcohol-related HCC compared to other etiologies (27). MicroRNA-34a* appeared to act in synergy with the miR-

34a with a better range of potential target (47). Furthermore, miR-34a is significantly increased in ALD (48,49), and appears to promote oxidative stress and lipid accumulation through SIRT1 down-regulation (50,51).

MATERIALS AND METHODS

Study subjects

One hundred and sixty-five Caucasian patients were included in the study. Forty-nine subjects were healthy controls without liver disease neither AUD (controls group), 71 had a diagnosed ALD without liver cancer (ALD group) and 45 had a HCC-related to alcohol (HCC group).

Non-alcoholic liver disease was systematically ruled out by screening the hepatitis B and C virus serologies and the serum assay for iron, transferrin and ferritin saturation, ceruleoplasmin, alpha-1-antitrypsin deficiency and antinuclear, anti-smooth muscle, anti-LKM1 and antimitochondria antibodies.

Samples extraction and quantification

MicroRNAs were extracted from 200 μ L of blood serum using an automatic nucleotide acid purification system (Maxwell[®] RSC, Promega). Then, a qRT-PCR protocol (StepOne plus, Applied Biosystems) was conducted to assess miRNAs levels in each condition using TaqMan primers (Applied Biosystems and Cel-miR-39 spike-in kit from QIAGEN).

Statistical analysis

All data analyses were conducted using SigmaStat 11.0 software (LogiLabo, Paris, France). Data from the quantification of miRNAs were analyzed by a 1-way ANOVA followed by a Kruskal-Wallis post-hoc test when normality failed. We used receiver operating characteristic (ROC) curves and the

area under the curve (AUC) to evaluate the potential application of miRNAs to differentiate ALD and HCC groups. We applied a Chi-square test to assess the efficacy of each combination of miRNA after the selection of the best point of discrimination by using ROC analyses. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Correction for multiple analyses was used using an α of 0.05 divided by the number of significant test (52,53).

RESULTS

Comparison between the copies number of each miRNA quantified in blood serum

To assess the usefulness of miRNAs as biomarkers of ALD development and notably ALD-related HCC cases, we quantified the circulating copies of each of the five preselected candidate miRNAs.

All of these five miRNAs are significantly increased in ALD compared to healthy subjects (Figure 1). miR-122 is significantly increased in both ALD ($1.8 \cdot 10^8$ copies per mL, $p < 0.001$) and alcohol-related HCC ($4.1 \cdot 10^8$ copies per mL, $p < 0.001$ vs controls; $p = 0.019$ vs ALD). miR-155 is significantly increased in ALD blood flow ($6.9 \cdot 10^7$ copies per mL, $p < 0.001$) and also in ALD-related HCC ($1.7 \cdot 10^8$ copies per mL, $p < 0.001$ vs controls; $p = 0.006$ vs ALD).

MicroRNA-21, miR-34a* and miR-126* are statistically significantly increased in ALD patients (respectively $p < 0.001$, $p < 0.05$, $p < 0.001$ and $1.0 \cdot 10^9$, $3.9 \cdot 10^7$ and $3.3 \cdot 10^7$ copies per mL) but not significantly in alcohol-related HCC.

ROC curve analysis of each miRNA for the discrimination of ALD from healthy subjects, and HCC from ALD.

Secondary to the quantification, we proceed to a ROC curve analysis of each miRNA to evaluate the potential as ALD or ALD-related HCC biomarker.

As seen in Figure 2, our results showed that all of these miRNAs were statistically significantly linked to ALD with an area under the curve (AUC) of 0.742 ($p < 0.001$), 0.991 ($p < 0.001$), 0.950 ($p < 0.001$), 0.976 ($p < 0.001$) and 0.906 ($p < 0.001$) respectively for miR-122, miR-155, miR-21, miR-34a* and miR-126*. Using these data, we established cut-off values for each miRNA (Table 1). At the cut-off values of $3.25 \cdot 10^7$ copies for miR-122, $3.25 \cdot 10^6$ copies of miR-155, $1.85 \cdot 10^8$ copies of miR-21, $3.40 \cdot 10^6$ copies of miR-34a* and $6.5 \cdot 10^6$ copies of miR-126*, sensitivity and specificity were respectively of 85.3% and 48.0%, 98.3% and 93.9%, 83.7% and 93.9%, 90.7% and 95.92%, 77.2% and 89.8%.

In an ALD-related HCC context, we analyzed the potential application of each of these miRNAs for the discrimination between HCC and ALD cases. As seen in Figure 1, the miR-122 and miR-155 are the only one statistically increased in HCC compared to ALD. We obtained an AUC of 0.65% ($p = 0.007$), 0.64% ($p = 0.011$), 0.50% (NS), 0.55% (NS) and 0.51% (NS), respectively for $6.95 \cdot 10^7$ copies of miR-122, $6.85 \cdot 10^7$ copies of miR-155, $1.45 \cdot 10^9$ copies of miR-21, $3.75 \cdot 10^7$ copies of miR-34a* and $1.05 \cdot 10^7$ copies of miR-126*.

Assessment of predictive values for each miR alone or in combinations

As the diagnostic value of each miRNA is limited, we combined these miRNAs to improve the positive predictive value (PPV) and the negative predictive value (NPV) (Table 2). As previously described, miR-122 and miR-155 are the only miRNAs with PPV-NPV significantly linked to ALD-related HCC compare to ALD, with respectively a 50.7% - 77.6% for miR-122 ($p = 0.002$) and 43.3% - 84.2% for miR-155 ($p = 0.024$). When combined together, we observed a PPV of 51.6% and a NPV of 76.9% ($p = 0.002$). Even if the results for the miR-34a* were inconclusive taking alone ($p = 0.72$), the results seem to improve when combined to miR-155 ($p = 0.011$), or miR-122

and miR-155 ($p < 0.001$) or with miR-122 and miR-155 and miR-21 ($p = 0.007$).

DISCUSSION

Recently, microRNAs have been found to be a useful tool for patient's follow-up and diagnostic (54,55). According to their half-life and release in body fluids, miRNAs have been studied in a majority of diseases, notably cancer (55,56). Viral hepatitis (HBV, HCV) is the first cause of HCC worldwide and leads to a restricting focus of miRNAs data in this field (17–22). Nevertheless, chronic alcohol misuse was still responsible of 30% of HCC deaths in 2015 (23). According to a growing literature corps and based on physiopathologic pathways, we have selected five candidate miRNAs involved in hepatocellular carcinogenesis (miR-122, miR-155 and miR-21), and notably in ALD-related HCC (miR-34a* and miR-126*).

We have firstly checked how it would be possible to extract and quantify our candidate miRNAs from supernatant of an *in vitro* model of HCC then from blood serum of an ALD animal model to validate our protocol and their availability in blood serum (data not shown). Our results confirmed the interest of the five candidate miRNAs chosen (miR-122, miR-155, miR-21, miR-34a* and miR-126*). In ALD and HCC groups, the five miRNAs present significantly higher blood levels when they are compared to healthy control ($p < 0.05$ for all). Moreover, data analysis displayed high sensitivity and specificity, as confirmed by an excellent AUROC score (respective AUROC score 0.74, 0.99, 0.95, 0.98 and 0.91). Our results are in line with literature as miR-122 serum levels are described to be elevated in several studies comparing HCC patients to healthy controls or patients suffering from chronic hepatitis (20,21,57). Consistently with our results on ALD, miR-122 levels have been described to be significantly increased in severe forms of NASH compared to early stage of the disease (58–60). Those results can be

easily explicated by the pleiotropic impact of miR-122 on liver physiology. Indeed, miR-122 promotes hepatic fatty-acid production and steatosis (61,62), it also causes intestinal permeability through the degradation of occludin mRNA (28) which leads to LPS translocation. Moreover, miR-122 was demonstrated to participate to the monocytes activation initiated from LPS and that leading to an inflammatory response and liver damages (29). Likewise, other studies have shown an increase of miR-155 and miR-21 levels in HCC patients when compared to an hepatitis group (20,57,63,64). Our results can be explained by the role of miR-155 and miR-21 in the immune and inflammatory responses described in ALD development. According to this hypothesis, it is worthy to note that miR-155 and miR-21 regulate p53/NFkB pathway which have been implicated in both lipogenesis and tumor growth (32,43).

In an other hand, it was previously described that miR-126* and miR-34a* levels were significantly increased in the end stage as ALD induced HCC (27,48). Our data point out the interest of miR-126* and miR-34a* also during the early stage of liver disease before the HCC stage. Our data are consistent with Shaker and Senousy who displayed an increase of miR-126 level among the F3 stage (vs F0 to F2) and among the F4 stage (vs F0 to F3) in NASH (65) and He et al who find a positive correlation between miR-126/126* levels (44). Likewise, our data on miR-34a* and the ALD group are consistent with NAFLD/NASH studies where miR-34a has been described to be correlated to steatosis severity (66,67) due to its main target, SIRT1, which regulates energy homeostasis (50,62,68). It is noteworthy that miR-34a* level could be mechanically increase during the same pathologic process, as they both act in synergy (47).

More interestingly, according to the increasing concentration across ALD stages, miR-122 and miR-155 blood levels seem to be closely related to the worsen symptoms of ALD including HCC (Fig 1-A and 1-B). In a clinical

purpose, these miRNAs could be useful to follow-up patients with an ongoing ALD to spot early-stages of HCC.

Alone, when the miRNAs blood levels are compared between ALD and HCC groups (Table 2-B), the intrinsic and extrinsic characteristics do not allow us to use miRNAs levels as tool to distinguish early and end stages of ALD including HCC. We suppose that due to its pleiotropic effects and taking alone a miRNA would not reach a useful specificity. To improve the test characteristics, we used a combination of miRNAs as it has already been used for NASH or viral hepatitis-related HCC. MicroRNAs signature is a commonly admitted strategy to improve the predictive value of miRNAs (38,59,64,69). Considering that miR-122 and miR-155 were both significantly increased in ALD-related HCC compared to ALD, we combined them to improve the intrinsic and extrinsic characteristics of the predictive tool. In fact, the miRNAs combination improved the AUROC score from poor to fair level. To improve the predictive test our data underline the interest of the use of candidate miRNAs and to use them as a signature of several miRNAs. To go further, we evaluated the interest of adding the miR-34a* and miR-126* to the miRNA combination as they were described specifically in ALD-induced HCC. Our correction for multiple analysis showed no profit to these combinations compared to miR-122/miR-155.

Our data suggest that miRNAs could be used as a follow-up tool of ALD, as AFP is used for HCC follow-up, through the assessment of miRNAs levels over time. To confirm our hypothesis a prospective study where miRNAs levels would be assessed during the liver disease evolution (through F0 to F4 and HCC) is necessary to validate the usefulness of miRNAs as a follow-up tool of ALD. Other miRNAs and biological features (e.g. transaminases, AFP) should also be considered to improve the tool. Other work should also recruit a group of patients suffering from AUD without ALD.

After the establishment of potential diagnostic threshold value for each of these miRNAs, we propose the miR-122 and miR-155 as potential biomarkers for the follow-up of ALD patients and possibly the early diagnostic of ALD-related HCC.

ACKNOWLEDGEMENTS

CAP is the recipient of a grant from the French Ministry of Research.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CAP, MN, ENK and HH designed all experiments. CAP and RB conducted the experiments. CAP, MN, ENK and HH analyzed the data and wrote the paper.

REFERENCES

1. Sheron N. Alcohol and liver disease in Europe--Simple measures have the potential to prevent tens of thousands of premature deaths. *J Hepatol.* avr 2016;64(4):957-67.
2. Cho Y, Lee J-H, Lee DH, Cho EJ, Yu SJ, Yi N-J, et al. Comparison of treatment outcome between living donor liver transplantation and sorafenib for patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria. *Oncotarget.* 18 juill 2017;8(29):47555-64.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* nov 2018;68(6):394-424.
4. EASL, European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* juill 2018;69(1):182-236.
5. Costentin CE, Mourad A, Lahmek P, Causse X, Pariente A, Hagège H, et al. Hepatocellular carcinoma is diagnosed at a later stage in alcoholic patients: Results of a prospective, nationwide study. *Cancer.* 28 mars 2018;
6. Barletta E, Tinessa V, Daniele B. [Screening of hepatocellular carcinoma: role of the alpha-fetoprotein (AFP) and ultrasonography]. *Recenti Prog Med.* juin 2005;96(6):295-9; quiz 328.
7. Trinchet JC, Ganne-Carrié N. Faut-il dépister le carcinome hépatocellulaire ? *Gastroenterol Clin Biol.* 2006;30:880-6.
8. Agopian VG, Harlander-Locke MP, Markovic D, Zarrinpar A, Kaldas FM, Cheng EY, et al. Evaluation of Patients With Hepatocellular Carcinomas That Do Not Produce α -Fetoprotein. *JAMA Surg.* 01 2017;152(1):55-64.
9. Sengupta S, Parikh ND. Biomarker development for hepatocellular carcinoma early detection: current and future perspectives. *Hepatic Oncology.* 2017;4(4):111-22.
10. Bofill-De Ros X, Yang A, Gu S. IsomiRs: Expanding the miRNA repression toolbox beyond the seed. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 4 avr 2019;
11. He B, He Y, Shi W, Gong S, Chen X, Xiao J, et al. Bioinformatics analysis of gene expression alterations in microRNA-122 knockout mice with hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep.* juin 2017;15(6):3681-9.
12. Latorre I, Leidinger P, Backes C, Domínguez J, de Souza-Galvão ML, Maldonado J, et al. A novel whole-blood miRNA signature for a rapid diagnosis of

- pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J.* avr 2015;45(4):1173-6.
13. Margue C, Reinsbach S, Philippidou D, Beaume N, Walters C, Schneider JG, et al. Comparison of a healthy miRNome with melanoma patient miRNomes: are microRNAs suitable serum biomarkers for cancer? *Oncotarget.* 20 mai 2015;6(14):12110-27.
 14. Keller A, Leidinger P, Lange J, Borries A, Schroers H, Scheffler M, et al. Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS ONE.* 13 oct 2009;4(10):e7440.
 15. Ptolemy AS, Rifai N. What is a biomarker? Research investments and lack of clinical integration necessitate a review of biomarker terminology and validation schema. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2010;242:6-14.
 16. Gantier MP, McCoy CE, Rusinova I, Saulep D, Wang D, Xu D, et al. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res.* juill 2011;39(13):5692-703.
 17. Sohn W, Kim J, Kang SH, Yang SR, Cho J-Y, Cho HC, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med.* 18 sept 2015;47:e184.
 18. Tat Trung N, Duong DC, Tong HV, Hien TTT, Hoan PQ, Bang MH, et al. Optimisation of quantitative miRNA panels to consolidate the diagnostic surveillance of HBV-related hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE.* 2018;13(4):e0196081.
 19. Grossi I, Arici B, Portolani N, De Petro G, Salvi A. Clinical and biological significance of miR-23b and miR-193a in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 24 janv 2017;8(4):6955-69.
 20. Ali HEA, Abdel Hameed R, Effat H, Ahmed EK, Atef AA, Sharawi SK, et al. Circulating microRNAs panel as a diagnostic tool for discrimination of HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* sept 2017;41(4):e51-62.
 21. Zekri A-RN, Youssef ASE-D, El-Desouky ED, Ahmed OS, Lotfy MM, Nassar AA-M, et al. Serum microRNA panels as potential biomarkers for early detection of hepatocellular carcinoma on top of HCV infection. *Tumour Biol.* sept 2016;37(9):12273-86.
 22. Salvi A, Abeni E, Portolani N, Barlati S, De Petro G. Human hepatocellular carcinoma cell-specific miRNAs reveal the differential expression of miR-24 and miR-27a in cirrhotic/non-cirrhotic HCC. *Int J Oncol.* févr 2013;42(2):391-402.
 23. Global Burden of Disease Liver Cancer Collaboration, Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, et al. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol.* 01 2017;3(12):1683-91.
 24. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 30 avr 2002;12(9):735-9.
 25. Ma J, Li T, Han X, Yuan H. Knockdown of LncRNA ANRIL suppresses cell proliferation, metastasis, and invasion via regulating miR-122-5p expression in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* févr 2018;144(2):205-14.
 26. Budhu A, Jia H-L, Forgues M, Liu C-G, Goldstein D, Lam A, et al. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* mars 2008;47(3):897-907.

27. Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, et al. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology*. juin 2008;47(6):1955-63.
28. Ye D, Guo S, Al-Sadi R, Ma TY. MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability. *Gastroenterology*. oct 2011;141(4):1323-33.
29. Momen-Heravi F, Bala S, Kodys K, Szabo G. Exosomes derived from alcohol-treated hepatocytes horizontally transfer liver specific miRNA-122 and sensitize monocytes to LPS. *Sci Rep*. 14 mai 2015;5:9991.
30. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 27 avr 2007;316(5824):608-11.
31. Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 14 févr 2006;103(7):2257-61.
32. Fu X, Wen H, Jing L, Yang Y, Wang W, Liang X, et al. MicroRNA-155-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by suppressing PTEN through the PI3K/Akt pathway. *Cancer Sci*. avr 2017;108(4):620-31.
33. Ashmawy AM, Elgeshy KM, Abdel Salam E-ST, Ghareeb M, Kobaisi MH, Amin HAA, et al. Crosstalk between liver-related microRNAs and Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma patients. *Arab J Gastroenterol*. sept 2017;18(3):144-50.
34. Zhang L, Wang W, Li X, He S, Yao J, Wang X, et al. MicroRNA-155 promotes tumor growth of human hepatocellular carcinoma by targeting ARID2. *Int J Oncol*. juin 2016;48(6):2425-34.
35. Ji J, Xu M, Tu J, Zhao Z, Gao J, Chen M, et al. MiR-155 and its functional variant rs767649 contribute to the susceptibility and survival of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 13 sept 2016;7(37):303-9.
36. Wotschovsky Z, Liep J, Meyer H-A, Jung M, Wagner I, Disch AC, et al. Identification of metastamirs as metastasis-associated microRNAs in clear cell renal cell carcinomas. *Int J Biol Sci*. 2012;8(10):1363-74.
37. Zhou L, Yang Z-X, Song W-J, Li Q-J, Yang F, Wang D-S, et al. MicroRNA-21 regulates the migration and invasion of a stem-like population in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. août 2013;43(2):661-9.
38. Zhuang C, Jiang W, Huang D, Xu L, Yang Q, Zheng L, et al. Serum miR-21, miR-26a and miR-101 as potential biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. sept 2016;40(4):386-96.
39. Amr KS, Ezzat WM, Elhosary YA, Hegazy AE, Fahim HH, Kamel RR. The potential role of miRNAs 21 and 199-a in early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Gene*. 1 janv 2016;575(1):66-70.
40. Thurnherr T, Mah W-C, Lei Z, Jin Y, Rozen SG, Lee CG. Differentially Expressed miRNAs in Hepatocellular Carcinoma Target Genes in the Genetic Information Processing and Metabolism Pathways. *Sci Rep*. 28 janv 2016;6:20065.
41. Wu N, McDaniel K, Zhou T, Ramos-Lorenzo S, Wu C, Huang L, et al. Knockout of microRNA-21 attenuates alcoholic hepatitis through the VHL/NF- κ B signaling pathway in hepatic stellate cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 31 mai 2018;315(3):G385-98.
42. Calo N, Ramadori P, Sobolewski C, Romero Y, Maeder C, Fournier M, et al. Stress-activated miR-21/miR-21* in hepatocytes promotes lipid and glucose

- metabolic disorders associated with high-fat diet consumption. *Gut*. 2016;65(11):1871-81.
43. Wu H, Ng R, Chen X, Steer CJ, Song G. MicroRNA-21 is a potential link between non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma via modulation of the HBP1-p53-Srebp1c pathway. *Gut*. 2016;65(11):1850-60.
 44. He H, Huang Y, Yang D, Liang B, Lin L, Li J-L, et al. [Expression of miR-126/miR-126* in hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical outcomes]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. oct 2014;34(10):1493-7.
 45. Gong C, Fang J, Li G, Liu H-H, Liu Z-S. Effects of microRNA-126 on cell proliferation, apoptosis and tumor angiogenesis via the down-regulating ERK signaling pathway by targeting EGFL7 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 8 août 2017;8(32):52527-42.
 46. Bao J, Yu Y, Chen J, He Y, Chen X, Ren Z, et al. MiR-126 negatively regulates PLK-4 to impact the development of hepatocellular carcinoma via ATR/CHEK1 pathway. *Cell Death Dis*. 12 2018;9(10):1045.
 47. Li D, Li J. Association of miR-34a-3p/5p, miR-141-3p/5p, and miR-24 in Decidual Natural Killer Cells with Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion. *Med Sci Monit*. 21 mars 2016;22:922-9.
 48. Meng F, Glaser SS, Francis H, Yang F, Han Y, Stokes A, et al. Epigenetic regulation of miR-34a expression in alcoholic liver injury. *Am J Pathol*. sept 2012;181(3):804-17.
 49. Li S, Chen X, Zhang H, Liang X, Xiang Y, Yu C, et al. Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. *J Lipid Res*. 1 sept 2009;50(9):1756-65.
 50. Lee J, Padhye A, Sharma A, Song G, Miao J, Mo Y-Y, et al. A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via microRNA-34a inhibition. *J Biol Chem*. 23 avr 2010;285(17):12604-11.
 51. McDaniel K, Herrera L, Zhou T, Francis H, Han Y, Levine P, et al. The functional role of microRNAs in alcoholic liver injury. *J Cell Mol Med*. févr 2014;18(2):197-207.
 52. Comings DE, Gade R, Wu S, Chiu C, Dietz G, Muhleman D, et al. Studies of the potential role of the dopamine D1 receptor gene in addictive behaviors. *Mol Psychiatry*. janv 1997;2(1):44-56.
 53. Perneger TV. What's wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ*. 18 avr 1998;316(7139):1236-8.
 54. Wang M, Yu F, Ding H, Wang Y, Li P, Wang K. Emerging Function and Clinical Values of Exosomal MicroRNAs in Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 7 juin 2019;16:791-804.
 55. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. oct 2008;18(10):997-1006.
 56. Nana-Sinkam SP, Croce CM. Clinical applications for microRNAs in cancer. *Clin Pharmacol Ther*. janv 2013;93(1):98-104.
 57. Bharali D, Banerjee BD, Bharadwaj M, Husain SA, Kar P. Expression Analysis of MicroRNA-21 and MicroRNA-122 in Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Exp Hepatol*. juin 2019;9(3):294-301.
 58. Jampoka K, Muangpaisarn P, Khongnomnan K, Treeprasertsuk S, Tangkijvanich P, Payungporn S. Serum miR-29a and miR-122 as Potential Biomarkers for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Microna*. 2018;7(3):215-22.
 59. Becker PP, Rau M, Schmitt J, Malsch C, Hammer C, Bantel H, et al. Performance

- of Serum microRNAs -122, -192 and -21 as Biomarkers in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. PLoS ONE. 2015;10(11):e0142661.
60. Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. Clin Chim Acta. 23 sept 2013;424:99-103.
 61. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. Cell Metab. févr 2006;3(2):87-98.
 62. Salvoza NC, Klinzing DC, Gopez-Cervantes J, Baclig MO. Association of Circulating Serum miR-34a and miR-122 with Dyslipidemia among Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. PLoS ONE. 2016;11(4):e0153497.
 63. Ezzat WM, Amr KS, Raouf HA, Elhosary YA, Hegazy AE, Fahim HH, et al. Relationship Between Serum microRNA155 and Telomerase Expression in Hepatocellular Carcinoma. Arch Med Res. 2016;47(5):349-55.
 64. Ning S, Liu H, Gao B, Wei W, Yang A, Li J, et al. miR-155, miR-96 and miR-99a as potential diagnostic and prognostic tools for the clinical management of hepatocellular carcinoma. Oncol Lett. sept 2019;18(3):3381-7.
 65. Shaker OG, Senousy MA. Serum microRNAs as predictors for liver fibrosis staging in hepatitis C virus-associated chronic liver disease patients. J Viral Hepat. 2017;24(8):636-44.
 66. Liu X-L, Pan Q, Zhang R-N, Shen F, Yan S-Y, Sun C, et al. Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of non-alcoholic steatohepatitis in a Chinese population. World J Gastroenterol. 28 nov 2016;22(44):9844-52.
 67. López-Riera M, Conde I, Quintas G, Pedrola L, Zaragoza Á, Perez-Rojas J, et al. Non-invasive prediction of NAFLD severity: a comprehensive, independent validation of previously postulated serum microRNA biomarkers. Sci Rep. 13 juill 2018;8(1):10606.
 68. Wu T, Liu Y, Fu Y, Liu X, Zhou X. Direct evidence of sirtuin downregulation in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. Ann Clin Lab Sci. 2014;44(4):410-8.
 69. Motawi TK, Shaker OG, El-Maraghy SA, Senousy MA. Serum MicroRNAs as Potential Biomarkers for Early Diagnosis of Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Patients. PLoS ONE. 2015;10(9):e0137706.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Blood serum quantification of each microRNA

Circulating miRNAs were extracted then quantified from 200µL of blood serum. MicroRNA-122 quantifications are represented in figure 1-A, miR-155 in 1-B, miR-21 in 1-C, miR-34a in 1-D and miR-126* in 1-E. Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA test. Each miR is significantly associated to ALD (without HCC) and alcohol-related HCC. miR-122 and miR-155 both are significantly associated to alcohol-related HCC when compared to ALD.*

Figure 2: Receiver operating characteristic (ROC) Curves for differentiating ALD from healthy controls (dotted line) or HCC from ALD cases (full line)

(A) miR-122 AUC is 74% in the comparison between controls and liver disease ($p < 0,001$), and 65% in ALD vs HCC ($p = 0,007$). (B) miR-155 AUC is 99% in the comparison between controls and liver disease ($p < 0,001$), and 64%

in ALD vs HCC ($p=0,011$). (C) miR-21 AUC is 95% in the comparison between controls and liver disease ($p<0,001$), and 50% in ALD vs HCC ($p=0,99$). (D) miR-34a* AUC is 98% in the comparison between controls and liver disease ($p<0,001$), and 53% in ALD vs HCC ($p=0,58$). (E) miR-126* AUC is 91% in the comparison between controls and liver disease ($p<0,001$), and 55% in ALD vs HCC ($p=0,38$). Full lign = HCC vs ALD, dashed lign = ALD+HCC vs healthy controls.

Table 1: Characteristics of each miRNA as potential biomarker of ALD and ALD-related HCC

Following a ROC analyse of each miR, thresholds value in number of copies/mL were

established and AUC calculated. ALD-related HCC cases were firstly combined to the ALD group and compared to healthy controls (Table 1-A), then HCC were compared directly to the ALD group (Table 1-B). Sensitivity and specificity are expressed in %. Results were analysed by a Chi-square test.

Table 2: Predictive value of each miRNA taking alone or in combination in ALD and ALD-related HCC discrimination

Positive and negative predictive value are expressed for each miRNA or combination of miRNAs in the discrimination of ALD cases compared to healthy controls (Table 2-A), and of ALD-related HCC compared to ALD (Table 2-B). Results were analysed by a Chi-square test.

Figure 1 :

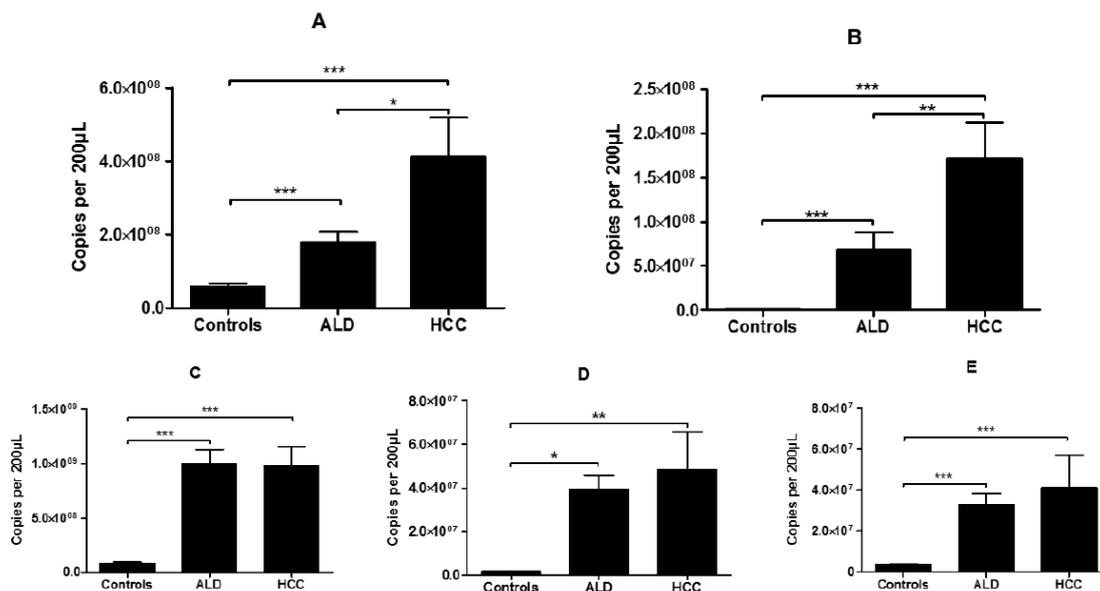


Figure 2 :

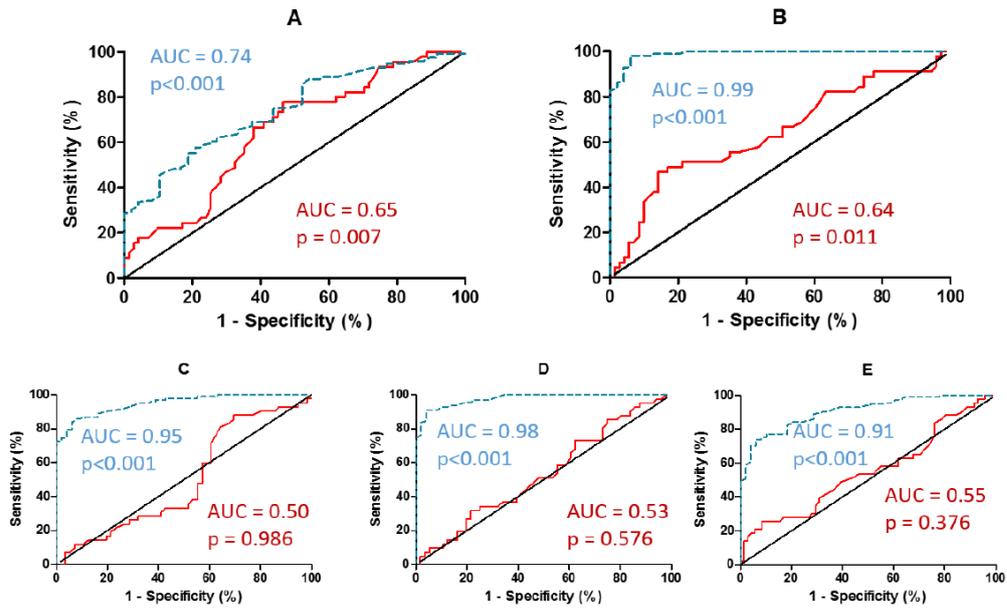


Table 1-A :

ALD+HCC vs Healthy					
miRNA	AUC	Thresholds	Sensitivity	Specificity	p
miR-122	0.7429	$3.25 \cdot 10^7$	85.34	47.92	<0,001
miR-155	0.9906	$3.25 \cdot 10^6$	98.28	93.88	<0,001
miR-21	0.9496	$1.85 \cdot 10^8$	83.67	93.88	<0,001
miR-34a*	0.9762	$3.40 \cdot 10^6$	90.72	95.92	<0,001
miR-126*	0.9057	$6.50 \cdot 10^6$	77.19	89.80	<0,001

Table 1-B:

HCC vs ALD					
miRNA	AUC	Thresholds	Sensitivity	Specificity	p
miR-122	0.6482	6.95.10 ⁷	77.78	53.52	0,007
miR-155	0.6407	6.85.10 ⁷	46.67	85.92	0,011
miR-21	0.5011	1.45.10 ⁹	88.10	30.36	0,986
miR-34a*	0.5333	3.75.10 ⁷	73.17	37.50	0,576
miR-126*	0.5496	1.05.10 ⁷	39.53	69.01	0,376

Table 2-A :

ALD+HCC vs Healthy			
miRNA(s)	Positive Predictive Value (%)	Negative Predictive Value (%)	p
miR-122	43,6	87,4	<0,001
miR-155	43,3	95,6	<0,001
miR-21	50,9	84,0	<0,001
miR-34a*	42,7	91,7	<0,001
miR-126*	36,8	83,3	0,004

Table 2-B :

HCC vs ALD			
miRNA(s)	Positive Predictive Value (%)	Negative Predictive Value (%)	p
miR-122	50,7	77,6	0,002
miR-155	43,3	84,2	0,024
miR-21	50,9	66,7	0,077
miR-34a*	43,7	61,5	0,723
miR-126*	38,1	59,4	0,803
miR-122+155	51,6	76,9	0,002
miR-122+155+34a*	59,6	75,0	<0,001
miR-122+155+126*	48,2	70,0	0,04

Chapitre Quatre : Discussions et Conclusions

Dans sa forme compensée, la MAF est caractérisée par un processus pathologique silencieux et évolutif qui se développe durant plusieurs années. Les mécanismes immuno-inflammatoires et de stress oxydatif sont les principales voies physiopathologiques décrites dans la MAF (EASL, 2018; Gao and Bataller, 2011). L'éthanol et son principal métabolite (l'acétaldéhyde) sont à l'origine des mécanismes physiopathologiques retrouvés dans les différentes étapes de la trajectoire de la MAF. En effet, au niveau hépatique le cumul des consommations inadaptées d'alcool aboutit à une souffrance cellulaire, un environnement inflammatoire et, après plusieurs années d'accumulation, au remplacement progressif du tissu fonctionnel par un tissu de cicatrisation fibreux. La généralisation de cette fibrose est considérée comme un état précancéreux car plus de 85% des CHC se superposent à un foie cirrhotique (Lata, 2010). En Europe, plus de 2/3 des cas de CHC se développent sur une cirrhose liée à l'alcool (OMS, 2014a). Or si le CHC est classé au 3^{ème} rang des cancers les plus mortels en 2018, ce n'est pas seulement par manque de stratégies thérapeutiques mais dû à un repérage et diagnostic tardif (Bray et al., 2018). En effet, 77% des CHC repérés précocement reçoivent un traitement curatif et leur taux de survie à 5 ans est évalué entre 50 et 80% (Ganne-Carrié et al., 2018). Malheureusement plus de la moitié des diagnostics sont posés à un stade intermédiaire ou avancé du CHC, état auquel un traitement curatif n'est plus envisageable. Malgré les nombreuses thérapies développées à ce jour, la médiane de survie de ces patients est respectivement de 16 et 11 mois (Llovet et al., 2008; Zhang et al., 2018a).

Ce diagnostic tardif s'explique majoritairement par l'absence de symptômes spécifiques dans les phases précoces du développement du CHC. Mais aussi par le délai entre le développement d'un trouble lié à l'usage de l'alcool et la première consultation avec un spécialiste qui excède en moyenne 10 ans (Thursz et al., 2018). Enfin, et c'est sur ce point que cette thèse se concentre, sur le manque de marqueurs prédictifs et de suivi de la MAF. L'AFP est le marqueur non-invasif du CHC le plus utilisé, notamment dans le cadre du suivi du CHC, et pourtant près de la moitié des CHC ne produiraient pas d'AFP (Sengupta and Parikh, 2017). De plus, l'AFP présente des caractéristiques relativement faibles pour un test clinique : une sensibilité de 60% au seuil de référence pour le diagnostic du CHC, et une valeur prédictive positive de 41,5% (Barletta et al., 2005; Trevisani et al., 2001).

Si l'on considère le diagnostic de certitude du CHC par la ponction biopsie-hépatique (PBH), là aussi plusieurs éléments expliquent la difficulté à diagnostiquer le CHC. Effectivement, en

2008 Compagnon et collaborateurs observaient que 20% des transplantations hépatiques à visée curative dans le cadre d'un CHC sans PBH étaient réalisées sur un foie sans atteinte tumorale (Compagnon et al., 2008). Ce rapport démontre la nécessité de réaliser ce test, mais il est tout de même à noter que la PBH n'est pas sans faille. Premièrement il faut que le patient soit capable de supporter un acte chirurgical, c'est-à-dire qu'il ait des fonctions hépatiques permettant d'éviter les complications hémorragiques, mais aussi qu'il ne présente pas d'ascite qui pourrait augmenter le risque de sepsis. Enfin, outre le coût d'une telle procédure (estimé à environ 3000\$) et la balance bénéfique/risque, il est à souligner que la sensibilité de la PBH n'est que de 70%, et 61% dans le cas d'une seconde PBH (Forner et al., 2008).

Ainsi, dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à des marqueurs circulants et pertinents dans le cas du développement tumoral : les miARNs, qui peuvent ainsi servir à l'élaboration de tests non-invasifs. Ces petits ARNs simple brins possèdent de multiples avantages comme potentiels biomarqueurs : ils sont retrouvés dans tous les fluides corporels (sang, salive, urine, ...) (Hanson et al., 2009) où ils sont très stables grâce aux cargos des vésicules extracellulaires les transportant (Gantier et al., 2011), certains possèdent leurs propre promoteur de gènes quand d'autres sont intégrés dans la partie non-codante de gènes ce qui leur offre une certaine spécificité (soit de tissu, soit d'une voie de signalisation ou d'une pathologie), et enfin se sont des acteurs actifs dans la régulation épigénétique d'environ 60% du génome humain (Hafner et al., 2012).

De ce fait, l'objectif de cette thèse était d'évaluer l'intérêt d'un profil de miARNs circulants comme marqueur de la transition entre la MAF et le CHC. Dans ce chapitre nous allons donc discuter de nos résultats dans nos différents modèles ainsi que chez l'Homme et de la potentielle utilisation des miARNs en clinique.

1. Modélisation Cellulaire

Afin de vérifier l'intérêt des miARNs comme biomarqueurs de la MAF et du CHC lié à l'alcool, nous avons dans un premier temps étudié la biodisponibilité de nos miARNs d'intérêt au niveau cellulaire et extracellulaire de cellules de lignée Huh-7 exposées 6 mois à un nouveau protocole d'alcoolisation cellulaire.

1.1 Etablissement du modèle

La première partie de ce travail a consisté en la mise au point de ce nouveau protocole d'exposition chronique à de l'alcool. La construction de ce nouveau modèle vient d'un simple constat lors des premiers tests d'alcoolisation de lignées cellulaire en culture : une exposition pendant 24 ou 72 heures à des concentrations entre 0 et 1% d'éthanol ne modifie pas les caractéristiques des cellules (morphologie, prolifération, migration, marqueurs de surface, ...). Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'alcool, comme certains traitement testés *in vitro*, induit des modifications de phénotypes via l'acquisition d'une certaine résistance obtenue après une exposition chronique durant plusieurs mois (Dong et al., 2017a).

Nous avons ainsi opté pour une lignée cellulaire de CHC de stade précoce, les cellules Huh-7, qui ont l'avantage contrairement aux cellules HepG2 utilisées dans les précédents modèles (Neuman et al., 1999; Tang et al., 2016) d'avoir un métabolisme de l'éthanol et de ses métabolites intact. Nous les avons exposées à différentes doses d'éthanol de manière stable, en rajoutant quotidiennement un volume de milieu alcoolisé correspondant à l'alcool métabolisé et/ou évaporé au cours des 24 dernières heures, pendant 8 mois.

Ce modèle n'est donc pas un « modèle idéal » de CHC lié à l'alcool à proprement parlé. En effet, les hépatocytes cancéreux et les hépatocytes sains n'expriment pas les mêmes caractéristiques (Zeilinger et al., 2016). Cependant, il est intéressant de remarquer que suite notre protocole d'alcoolisation de cellules Huh-7, il apparait des caractéristiques comparables aux cellules de CHC issues de résection hépatique (Rozeik et al., 2017; Zhao et al., 2016). Ainsi nous observons une morphologie cellulaire et des marqueurs de surface cellulaire cohérents avec une transition épithélio-mésenchymateuse

En effet, après plusieurs mois d'exposition à de l'alcool de manière quotidienne nous avons observé diverses altérations dans les phénotypes de nos cellules. Le premier à être apparu est une modification morphologique avec un aspect étoilé, une réduction du cytoplasme et des contacts plus réduits entre les cellules alcoolisées. Ces modifications obtenues suite à une exposition chronique à 80mM d'éthanol pourraient s'expliquer par une déshydratation induite par l'alcool. Et pourtant, celle-ci n'a pas d'impact sur le cycle cellulaire des cellules qui continuent de proliférer de manière stable, ni sur l'apoptose. De plus il est intéressant de noter que les cellules alcoolisées présentent une augmentation significative de leurs capacités de migration comparativement aux cellules contrôles, et qu'elles présentent à leur surface une augmentation significative de l'expression de marqueurs de cellules souches cancéreuses qui sont associés significativement avec l'agressivité du CHC (Rozeik et al., 2017; Zhao et al., 2016). Pris ensemble, ces résultats indiqueraient que les cellules Huh-7 exposées chroniquement à de l'alcool entameraient une transition épithélio-mésenchymateuse. Il s'agit d'un processus physiopathologique jouant un rôle crucial dans la progression, les capacités métastatiques et la sévérité de la tumeur (Giannelli et al., 2016; Kalluri and Weinberg, 2009).

1.2 Production cellulaire des miARNs

Suite à une exposition chronique à 80mM d'éthanol nous observons une augmentation significative d'expression intracellulaire pour les miR-122, miR-34a*, miR-126*, miR-29a et miR-223. Les augmentations d'expression des miR-155, miR-21 et miR-212 ne sont quant à elles pas statistiquement significatives (respectivement à $p=0,10$; $p=0,10$ et $p=0,13$) mais le manque de puissance statistique due à un nombre d'expérimentation limité ($n=3$) n'est pas à exclure.

Ainsi, après une exposition chronique à l'alcool, chacun de ces 8 miARNs est surexprimé entre 225 à 825% de leur expression normale dans les cellules Huh-7 non-exposées. Ces résultats semblent cohérents avec la littérature utilisée pour sélectionner nos miARNs d'intérêt (Abou-Alfa et al., 2018; Bala et al., 2016; Ma et al., 2018; McDaniel et al., 2014) sauf pour les miR-126*, miR-29a et miR-212 qui avaient été observés en quantité réduite dans le CHC (Dou et al., 2015; Ladeiro et al., 2008; Ma et al., 2019). Nous supposons que nos résultats contradictoires pour ces 3 miARNs proviennent de notre méthodologie de culture cellulaire,

que cela soit le choix de notre lignée cellulaire, ou le fait de travailler en 2D. Effectivement, les miARNs sont des régulateurs impliqués dans les communications intercellulaires (Desdín-Micó and Mittelbrunn, 2017). Par exemple le miR-29a serait sous-exprimé secondairement à l'activation des CEF et à la libération de TGF- β dans l'environnement hépatique (Bandyopadhyay et al., 2011). Sans ces communications intercellulaires entre les différentes cellules impliquées dans la physiopathologie de la MAF, les boucles de rétro-contrôles ne seraient donc pas activées. Cela peut expliquer nos résultats pour les miR-126*, miR-29a et miR-212 qui sont pour rappel impliqués dans la régulation de l'angiogenèse (miR-126* et miR-29a), la perméabilité intestinale (miR-29a et miR-212) et l'activation des CEF (miR-29a et miR-212) (Bandyopadhyay et al., 2011; Gong et al., 2017; Hu et al., 2016; Jing et al., 2017; Tang et al., 2008b; Zhou et al., 2010; Zhu et al., 2018).

De plus, la quantification des miARNs dans le surnageant cellulaire n'a démontré aucune augmentation statistiquement significative du taux de sécrétion des miARNs. Pourtant, si seuls les miR-155 et miR-223 semblent stables dans les 2 conditions (à 103% et 87% des taux contrôles, respectivement), la sécrétion des autres miARNs semble suivre une tendance à l'augmentation (171 à 489% des taux contrôles, non statistiquement significatives).

Ainsi, malgré une production significativement augmentée de miARNs intracellulaires, nous observons une réduction du ratio de miARNs qui sont sécrétés dans le surnageant des cellules exposées à de l'alcool. Ces réductions de ratio ne sont pas statistiquement significatives excepté dans le cas du miR-223 ($p=0,031$; $t=3258$). Là encore, nous conjecturons que ce résultat est dépendant de la méthodologie de culture et des altérations morphologiques induites par l'alcool. En effet, il est reconnu dans la littérature que pour étudier les communications paracrine *in vitro*, la culture cellulaire en 2D est insuffisante (Ansorge and Pompe, 2018). En effet ce type de communication dépend de l'environnement cellulaire comme la dureté de la surface de culture ce qui peut expliquer une réduction de la sécrétion de messagers lors du culture sur plastique (en opposition aux cultures sur collagène) (Charras and Sahai, 2014). De plus, nous notons un isolement des cellules alcoolisées, avec quelques contacts via des prolongements. Ainsi il est possible que cette réduction des messagers sécrétés dans le surnageant se fasse en parallèle d'une réduction des contacts directs entre les cellules et d'un isolement des cellules exposées au toxique.

A la vue de ces résultats, nous concluons qu'une exposition chronique à de l'alcool chez des cellules de la lignée cellulaire Huh-7 induit une sur-expression de nos miARNs d'intérêt. En ce qui concerne la sécrétion de ceux-ci dans le milieu extracellulaire, nous émettons l'hypothèse que ce phénomène est dépendant de l'environnement dans lequel la cellule se développe et de ses contacts avec les cellules avoisinantes. Or, dans notre cas, les cellules exposées chroniquement à 80mM d'éthanol s'isolent et réduisent leurs contacts intercellulaires, ce qui peut expliquer la réduction du ratio entre les miARNs produits et les miARNs sécrétés dans le surnageant.

1.3 Modèle *in vitro* idéal ?

Si nous devons donc imaginer un modèle *in vitro* idéal permettant l'étude de la production et de la sécrétion de miARNs dans le cas de la MAF, la culture la plus adaptée serait une co-culture de cellules prélevées sur un foie atteint de MAF. Cependant, cette méthodologie présente différentes difficultés : l'obtention d'échantillons en quantité et nombre suffisant, mais aussi la culture des cellules primaires humaines, surtout quand un si grand nombre de cellules interagissent ensemble (hépatocytes, CEF, cellules de Kupffer, cellules immunitaires, ...), qui nécessitent chacune des conditions de culture très spécifiques avec des milieux différents. En pratique il nous semble donc très compliqué de développer ce genre de modèle.

La solution la plus réaliste serait de travailler sur un modèle d'organoïde. C'est-à-dire sur un organe artificiel microscopique qui se développe à partir de cellules souches (Günther et al., 2019). Dans ce modèle les cellules utilisées peuvent être des cellules souches adultes spécifiques du foie obtenues par biopsie, ou bien des CSPi obtenus par prise de sang par exemple. Ces cellules vont proliférer et s'organiser tridimensionnellement de telle sorte à faire un micro-organe. Il est aussi possible de réaliser des organoïdes multicellulaires, en y ajoutant notamment des cellules de Kupffer ou des CEF afin d'observer des interactions directes à l'origine même de la fibrose par exemple (Leite et al., 2016; Prestigiacomo et al., 2017). Ainsi selon cette méthodologie, l'on pourrait étudier les échanges entre cellules provenant de foies atteints, si ce n'est étudier de manière plus précise la physiopathologie de la MAF.

Afin de corriger les limitations des études *in vitro* précédemment décrites, il est possible d'utiliser une méthodologie *ex vivo*. En effet, la technique de *precision-cut liver slices* permet

l'obtention de tranches d'environ 250µm d'épaisseur à partir d'un échantillon de foie (humain ou animal), soit environ 250 tranches pour un prélèvement de 10g (Fisher and Vickers, 2013). Ces tranches sont ensuite cultivables pendant 8 à 15 jours (mais une perte des fonctions peut apparaître dès le 3^e jour) et ont l'avantage d'être représentatives de l'organe en gardant à la fois sa structure et sa composition cellulaire (Westra et al., 2013). Dans le cadre de notre travail sur la recherche de biomarqueurs circulants en lien avec une communication intercellulaire dans le cas de la MAF, cette méthodologie semble de grand intérêt. En effet cette technique permettrait d'étudier directement la biodisponibilité des miARNs dans un tissu malade, ce qui, en plus d'être pertinent dans la recherche de biomarqueurs, pourrait aussi être utilisé dans l'évaluation des miARNs comme stratégie thérapeutique.

2. Modélisation Animale

Afin de se soustraire aux limites du modèle d'étude *in vitro*, nous avons donc voulu étudier l'intérêt de nos miARNs dans un modèle biologique intégré et plus pertinent. En effet, les miARNs étant des messagers importants pour la communication intercellulaire et dans la régulation de divers processus (comme les processus immuno-inflammatoire, le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale, ...) difficilement modélisable *in vitro*, il nous semblait nécessaire d'étudier leur taux circulants dans un modèle intégré afin d'évaluer leur intérêt comme biomarqueur lors de test non-invasif au préalable d'étude humaine.

2.1 Etablissement du modèle

L'objectif de notre travail est de s'intéresser spécifiquement au cas de la MAF. Ainsi nous avons choisi d'utiliser un modèle animal de MAF induit uniquement par exposition chronique à de l'alcool, sans utiliser d'autres toxiques non-retrouvés dans la physiopathologie de la MAF. Pour ce faire, nous avons utilisé l'une des seules méthodologies capable d'induire des éthanolémies significatives (>1,5 g/L) sur une période de temps prolongée, l'exposition à des vapeurs d'éthanol.

La mise au point de ce protocole a nécessité différents réglages afin de limiter la mortalité précoce, qu'elle fasse suite à un état de déshydratation important, ou bien à un déséquilibre

dans l'ordre social entre les animaux. Pour cela nous avons mis en place au préalable une période d'habituation pour le groupe social pendant 7 jours dans les enceintes d'inhalation sans alcool. Suite à cette période, les souris sont exposées de manière progressive à des durées croissantes d'exposition à des vapeurs d'éthanol. Les premiers jours, les souris sont exposées 6h/24 jusqu'à atteindre 18h/24 au bout de 6 jours. Ces 2 périodes d'habituation permettent à la fois une stabilisation du groupe social avant le début du protocole, pour réduire les risques d'agressions entre les souris résistantes et les souris les plus faibles, mais aussi de s'habituer graduellement à l'alcool. D'expérience au sein de notre laboratoire, ces mesures ont démontré une réduction de la mortalité lors des premiers jours du protocole. De même nous avons réduit le temps d'exposition initial qui était de 24h/24 à une exposition intermittente 18h/24 afin de réduire la mortalité tout en augmentant l'impact du protocole sur le foie.

Cependant l'exposition aux vapeurs d'éthanol seule ne s'est pas avérée suffisante pour obtenir des signes d'hépatopathies systématiques. A ce traitement nous avons décidé d'ajouter des éléments retrouvés dans la physiopathologie humaine : le gavage de LPS afin d'augmenter la translocation de celui-ci dans la circulation sanguine; et une exposition de type *binge drinking* par injections IP. Le gavage au LPS permet notamment de compenser le manque de dysbiose intestinale à l'origine de la perméabilité intestinale normalement retrouvée chez les patients atteints de MAF et qui n'était pas retrouvée chez nos souris à cause du mode d'exposition respiratoire et non digestif. Le LPS permet aussi d'induire un environnement hépatique pro-inflammatoire à l'origine même de la MAF. Quant à l'injection IP d'éthanol à 4g/kg tous les 3 jours, elle a pour objectif de se rapprocher d'un mode de consommation retrouvé chez l'Homme, avec des pics élevés de consommations à l'origine d'atteintes hépatiques aiguës. De plus, l'injection intrapéritonéale, en plus de permettre un passage rapide de l'éthanol dans le sang, permet l'induction d'un environnement inflammatoire au niveau abdominal, et donc hépatique.

2.2 Quantification plasmatique des miARNs

De manière intéressante, nos résultats chez la souris exposée ou non à l'éthanol et au LPS montrent différentes variations dans les taux de miARNs circulants. Ainsi les miR-155 et miR-

212 sont retrouvés en plus grandes quantités dans le sang de souris exposées chroniquement à l'alcool et LPS ($p=0,039$ et $p=0,066$ respectivement), ce qui peut s'expliquer par l'importance du miR-155 dans la régulation de l'inflammation (Bala et al., 2016; Mashima, 2015) et par celle du miR-212 dans celle de l'intégrité de la barrière intestinale (Tang et al., 2008b, 2015). Or ces 2 effets sont directement induits la combinaison entre les vapeurs et les injections d'éthanol ainsi que le gavage au LPS.

A l'opposé, les miR-34a* et miR-223 sont libérés en quantités inférieures dans le sang de souris exposées à de l'alcool ($p=0,008$ et $p=0,017$ respectivement). Cette réduction significative du taux de miR-34a* circulant semble en adéquation avec les travaux de Guennewig et ses collaborateurs qui décrivaient une réduction significative de la production de miR-34a* par les macrophages humains mis en présence de LPS, et ceux de Jiang et alii qui observent la même relation entre inflammation dépendante du LPS et le miR-34a chez des macrophages murins (Guennewig et al., 2014; Jiang et al., 2012). Pour ce qui est de la réduction des taux de miR-223 circulants, ceux-ci sont en accord avec les travaux de Li et collaborateurs qui démontraient que le miR-223 empêche l'infiltration de neutrophiles et la production de ROS dans le cadre de la MAF chez la souris (Li et al., 2017b). Or, l'infiltration de polynucléaires neutrophiles est un élément histologique récurrent observé lors de nos analyses post-mortem.

Enfin les taux des autres miARNs ne semblent pas être altérés de manière significative par l'exposition à l'alcool. Cela peut s'expliquer par différents facteurs et notamment leur implication dans les phénomènes de prolifération cellulaire et leur rôle d'oncomiR, qui ne sont pas des processus mis en jeu dans notre modèle d'exposition aux vapeurs d'éthanol (Amr et al., 2016; Dou et al., 2015; Ladeiro et al., 2008; Ma et al., 2018).

2.3 Limites du modèle

Bien que ces premiers résultats confirment l'utilité des miARNs comme biomarqueurs circulants ainsi que la faisabilité de notre protocole, nos résultats ne permettent pas de conclure sur l'intérêt de nos miARNs présélectionnés dans le cadre de la MAF chez l'Homme due aux limitations de ce modèle.

Les limites du modèle viennent des différences physiologiques entre l'Homme et le murin. Tout d'abord, le rongeur n'ayant pas d'appétence pour l'alcool, afin d'avoir des niveaux d'exposition à l'alcool suffisants pour induire des dommages hépatiques, cela nécessite d'utiliser des méthodologies d'expositions différentes de celle utilisée par l'Homme. Ainsi l'exposition à l'alcool se faisant ici par la voie respiratoire, celle-ci n'aura pas le même impact sur certains système, et notamment le système intestinal. Or le système intestinal apparait comme un élément clé dans le développement de la MAF de par la dysbiose et la perméabilité intestinale qu'elle engendre.

De plus nos miARNs d'intérêt ne sont pas uniquement produits par les hépatocytes mais aussi les CEF, les cellules de Kupffer ou les neutrophiles qui s'infiltrent dans le parenchyme. Or, si ces neutrophiles sont des éléments clé de la physiopathologie humaine de la MAF (Nguyen-Khac et al., 2018; Thursz et al., 2018), ils ne représentent que 10-25% des leucocytes circulants chez la souris contre 50-70% chez l'Homme (Mestas and Hughes, 2004). Cette différence peut induire des différences de recrutement du système immunitaire, donc une physiopathologie différente chez le rongeur ce qui peut se traduire par des expressions de miARNs différentes.

De plus, ces différences biologiques entre murins et l'Homme rendent complexe la qualification des atteintes obtenues. En effet, lors de nos études histologiques nous avons observés des atteintes hépatiques (stéatose, infiltration de polynucléaires, foyer hépatique, ...) mais celles-ci n'étaient pas présentes au niveau centrolobulaire comme c'est le cas chez l'Homme. Les atteintes retrouvées chez l'animal sont plus focales, généralement périlobulaire, au contraire des atteintes chez l'Homme qui sont généralisées et atteignent particulièrement le parenchyme dans le cas de la MAF. Ce manque de comparaison rend ainsi plus compliqué l'analyse et nous oblige à parler d'un modèle animal d'exposition à l'alcool plutôt que de parler en termes d'atteintes somatiques.

Une hypothèse pouvant expliquer en partie le manque d'atteintes généralisées serait la durée du protocole. En effet, malgré toutes les précautions prises et une surveillance accrue des animaux, après nos différents tests nous avons observé un taux de mortalité corrélé à l'intensité de l'exposition. Et de manière intéressante, nous avons remarqué que la majorité des décès recensés a eu lieu non pas au début ni à la fin du protocole mais durant la phase intermédiaire entre 10 et 20 jours d'expositions. Cette période nous semble donc primordiale. Ainsi un protocole qui s'étend sur de plus longues périodes comme le nôtre sélectionnerait

potentiellement les animaux résistants à la MAF, tandis que ceux décédant en milieu de procédure sont peut-être ceux atteints d'hépatite alcoolique.

Au total nos résultats de quantifications de miARNs circulants dans un modèle d'exposition chronique à l'alcool sont cohérents avec les traitements reçus par nos animaux et l'intensité des atteintes hépatiques engendrées par le protocole d'exposition. Ainsi, nous n'observons pas de variations de nos oncomiRs. Ces résultats encourageants démontrent la pertinence des miARNs circulants comme biomarqueurs utilisables lors de tests non-invasifs et la faisabilité de notre protocole dans ce contexte.

3. Résultats Cliniques

Durant nos premiers tests chez l'Homme, nous avons quantifié 5 miARNs dans 3 groupes de patients : des patients sans atteintes hépatiques ni TUA, un groupe de patient atteints de MAF non-cancéreuse et un groupe de patients atteints de CHC lié à l'alcool. L'objectif de ces groupes étant d'évaluer les niveaux de chaque miARNs en suivant la trajectoire de la MAF jusqu'au CHC. Cela nous permet à la fois d'évaluer les miARNs comme marqueurs de suivi de la pathologie, mais aussi de s'assurer du lien entre les taux circulants de miARNs et la MAF ou du CHC.

Ainsi nous avons montré que les miR-122, miR-155, miR-21, miR-34a* et miR-126* étaient significativement augmentés dans les cas de MAF en comparant tous les cas de MAF (de la fibrose au CHC) aux témoins sains. Ces résultats sont en adéquation avec la littérature. En effet, le miR-122 est décrit comme ayant un rôle prépondérant dans les fonctions hépatiques et notamment la lipogenèse (Esau et al., 2006; Salvoza et al., 2016) mais aussi la réponse inflammatoire via une double action de potentialisateur de la perméabilité intestinale (Ye et al., 2011) et de médiateur pro-inflammatoire sensibilisant les monocytes au LPS (Momen-Heravi et al., 2015a) ce qui en fait un élément clé dans la physiopathologie de la MAF. Parallèlement, il a été à plusieurs reprises rapporté comme significativement augmenté dans les formes sévères de NASH comparées aux formes précoces (Becker et al., 2015; Jampoka et al., 2018; Yamada et al., 2013). En ce qui concerne les miR-155 et miR-21, ceux-ci ont tous les

2 été observés comme significativement augmentés lors d'hépatopathies virales chroniques et notamment le CHC (Ali et al., 2017; Bharali et al., 2019; Ezzat et al., 2016; Ning et al., 2019). Cela s'explique par leur fonction de modulateur de la réponse immuno-inflammatoire, notamment via leur action inhibitrice de la voie de p53/NFκB ce qui induit la lipogenèse ou encore la prolifération tumorale (Fu et al., 2017; Wu et al., 2016).

Les miR-126* et miR-34a* avaient cependant été décrits comme liés au CHC d'origine alcoolique comparativement aux autres étiologies du CHC (Ladeiro et al., 2008; Meng et al., 2012). Nos résultats indiquent que ces 2 miARNs pourraient être retrouvés dès les premières étapes de la MAF avant le CHC. Effectivement nos résultats sont en accord avec ceux de Shaker et Senousy qui observaient une augmentation significative du miR-126 lors de fibroses F3 (comparées aux fibroses allant de F0 à F2) et lors de fibroses F4 (comparées à celles F0 à F3) (Shaker and Senousy, 2017), sachant que les niveaux de miR-126 et miR-126* sont positivement corrélés dans le CHC (He et al., 2014). Pareillement, le miR34a* qui agit en synergie avec le miR-34a (Li and Li, 2016) a été plusieurs fois corrélé à la sévérité de la NAFLD/NASH (Liu et al., 2016; López-Riera et al., 2018), probablement via son action inhibitrice sur SIRT1 ce qui induit l'accumulation de triglycérides (Lee et al., 2010; Salvoza et al., 2016; Wu et al., 2014).

Afin d'évaluer l'intérêt de nos miARNs comme biomarqueurs du suivi de la MAF jusqu'au CHC, nous avons également comparé les niveaux d'expressions de ces miARNs entre les patients du groupe CHC et ceux du groupe MAF. Dans ces conditions nous avons montré que les miR-122 et miR-155 sont d'autant plus liés au CHC qu'à la MAF. Nous supposons que l'augmentation significative de ces taux de miR-122 et miR-155 est due à l'importance de ces miARNs dans leurs voies physiopathologiques respectives. En effet, le miR-122 a la particularité d'être quasi-spécifique du foie où il représente le miARN majoritaire (Lagos-Quintana et al., 2002) ce qui s'explique par son effet pléiotrope dans les fonctions hépatique (Bandiera et al., 2015). Pour sa part le miR-155 est devenu l'un des oncomiRs les plus étudiés du fait de son implication dans la prolifération tumorale et dans les systèmes immuno-inflammatoires et hématopoïétiques (Gulei et al., 2019; Mashima, 2015; Testa et al., 2017) qui sont ainsi mis en place durant le développement de la MAF et plus encore durant celui du CHC (Fu et al., 2017; Kong et al., 2016; Zhang et al., 2016b).

Toutefois, même si un miARN peut être significativement associé à un phénotype pathologique, il paraît nécessaire d'utiliser une combinaison de miARNs afin d'établir un profil spécifique de la pathologie (Backes et al., 2016). En effet, considérant la pléiotropie de chaque miARN, le manque de spécificité de ces marqueurs semble être un frein à leur intérêt dans le suivi de la MAF ou de son diagnostic. Dans le but d'obtenir la meilleure combinaison, nous avons établi à l'aide de courbes ROC des seuils pour chacun des miARNs afin de discriminer les cas de CHC des cas de MAF sans CHC. A l'instar d'autres pathologies comme la tuberculose pulmonaire (Latorre et al., 2015), la sclérose (Keller et al., 2009) ou encore le mélanome (Margue et al., 2015), nous avons testé différentes combinaisons de miARNs afin d'évaluer si un profil de miARNs était plus indiqué que l'utilisation d'un seul miARN (Table 2).

Pris seuls, les miR-122 et miR-155 présentent une bonne valeur prédictive négative (la quantité circulante est en dessous du seuil établi lorsque les patients ne sont pas atteints) (VPN = 77,6% et 84,2% respectivement, $p < 0,05$ pour chacun) mais ont une valeur prédictive positive (le nombre de copies circulantes est supérieur au seuil établi quand la pathologie est présente) insuffisante (50,7% et 43,3% respectivement). En combinant les miARNs nous observons que la VPP tend à augmenter tandis que la VPN baisse légèrement (VPP combiné de 51,6% et VPP de 76,9%). De plus, si l'on y ajoute d'autres miARNs qui ne sont pourtant pas modifiés significativement dans le cas de CHC lié à l'alcool mais dans celui de la MAF, comme le miR-34a*, on obtient de meilleurs VPP (59,6%) malgré une réduction de la VPN (75,0%). Suite à une correction de Bonferroni qui permet de corriger les analyses multiples, nous ne constatons pas de différence significative entre la combinaison miR-122/miR-155 et la combinaison miR-122/miR-155/miR-34a*. On en déduit que la combinaison des miR-122 et miR-155 apparaît comme la plus pertinente dans le suivi des patients présentant une MAF documentée.

Si l'on compare nos résultats à ceux de l'AFP (Trevisani et al., 2001), qui a été étudié à plusieurs reprises dans le cadre du diagnostic du CHC mais qui en pratique est utilisé comme marqueur de suivi, on observe une excellente VPN de 97,7% pour l'AFP seul à 20ng/mL tandis que notre meilleure combinaison présente une VPN de 75,0%. Cependant l'AFP présente une VPP très insuffisante à 25,1% quand notre test est à 59,6%. Tout comme pour l'AFP, ces miARNs semblent donc d'intéressants biomarqueurs de suivi de la MAF dans un contexte clinico-biologique donné. Ce travail ne s'intéressant qu'à 5 miARNs présélectionnés, il sera cependant

intéressant d'implémenter notre liste de miARNs candidats à l'aide de miARNs d'intérêt identifiés lors d'études de criblage (comme les miR-29a, miR-212 ou miR-223), ainsi que d'évaluer l'intérêt d'un profil de miARNs combiné à des critères objectifs clinico-biologiques.

A l'instar de la charge virale dans les hépatites infectieuses, l'originalité de notre approche, en sus de s'intéresser spécifiquement à la MAF, est de réaliser une quantification absolue des miARNs circulants sélectionnés. En effet, la majorité des études s'intéressant aux miARNs en tant que biomarqueurs réalisent une semi-quantification en se rapportant à un miARN endogène comme standard interne. Notre approche a donc l'avantage d'être représentative et de se soustraire d'un biais de sélection du miARN endogène.

Ainsi nos résultats de quantifications chez l'Homme montrent l'utilité des miARNs circulants comme potentiels biomarqueurs dans un test non-invasif. Nous observons une augmentation significative de tous les taux de miARNs dans le sérum de patients atteints de MAF (CHC compris) en comparaison aux témoins sains. De plus, nous observons également une augmentation significative des taux de miR-122 et miR-155 dans les cas de CHC liés à l'alcool comparativement aux patients atteints de MAF sans CHC. En analysant nos résultats de quantification à l'aide de courbes ROC, nous avons déterminé des seuils de discrimination entre la MAF et les CHC liés à l'alcool qui permettraient un suivi de l'évolution de la MAF. L'utilisation de combinaisons de miARNs permet d'améliorer les valeurs prédictives de manière significative et donc l'intérêt clinique de cet outil. Nous proposons ainsi l'utilisation des miR-122 et miR-155 afin de réaliser le suivi de la MAF.

4. Conclusions

Pour conclure, l'objectif de cette thèse était d'évaluer l'intérêt clinique des miARNs circulants comme biomarqueurs de la MAF. Avant de pouvoir répondre à cette question, nous avons tout d'abord dû évaluer la présence de miARNs dans le compartiment extracellulaire *in vitro*.

Pour ce faire nous avons tout d'abord recherché les miARNs dans le surnageant de cellules de la lignée Huh-7 exposées quotidiennement à 80mM d'éthanol sur une période de 8 mois. Nous avons ainsi pu confirmer une production importante de miARNs et leur sécrétion dans le milieu des hépatocytes cancéreux en culture. Par ailleurs, nous constatons par imagerie optique que les cellules Huh-7 exposées chroniquement à de l'éthanol dans le milieu de culture s'isolent les unes des autres et réduisent les surfaces de contact intercellulaires. Nous supposons donc qu'une réduction des communications intercellulaires serait à la fois la résultante d'une exposition à l'alcool mais aussi des conditions de culture en monocouche sur une surface en plastique. Les miARNs étant des messagers intra et extracellulaires, il serait donc possible qu'une communication cellulaire réduite impliquerait une réduction des ratios de miARNs sécrétés chez les cellules exposées chroniquement à de l'alcool.

Afin de se soustraire aux biais inhérent à notre protocole de modélisation cellulaire en 2D d'hépatocytes cancéreux, nous avons quantifié nos miARNs d'intérêt dans le plasma sanguin de souris exposées chroniquement à de l'alcool par voies respiratoires et intrapéritonéales, ainsi qu'à du gavage de LPS. Ce modèle intégré a l'avantage de prendre en compte les interactions cellulaires et donc de refléter de manière plus pertinente l'activation de voies de signalisations impliquées dans la réponse au stress oxydatif et immuno-inflammatoire mises en jeu durant la physiopathologie de la MAF. Nos résultats ont ainsi montré que nos miARNs d'intérêt étaient retrouvés dans le plasma sanguin des souris et ont donc confirmé l'intérêt des miARNs comme biomarqueurs circulants. De plus, seuls les taux de miR-155, miR-34a* et miR-223 étaient modifiés significativement dans le plasma des souris exposées à l'alcool et aux LPS. Ces résultats nous permettent de confirmer qu'une exposition chronique à l'alcool seule n'entraîne pas une élévation significative de tous nos miARNs d'intérêt, mais que les différences de taux de miARNs circulants mesurées sont dues à l'activation de voies de signalisations spécifiques. De manière intéressante les miARNs dont les taux de sécrétion

n'étaient pas significativement différents entre les souris exposées ou non à l'alcool sont impliqués dans l'oncogenèse et la fibrogenèse. Tandis que les miARNs significativement liés à notre protocole sont des miARNs impliqués dans la réponse immuno-inflammatoire et l'intégrité de la barrière intestinale, qui sont 2 éléments de la physiopathologie de la MAF directement ciblés par notre protocole, et notamment par les injections IP d'éthanol et par gavage de LPS.

Cependant, la résistance des rongeurs à la MAF est une limite du protocole d'exposition à l'alcool qui ne nous permet pas d'obtenir des atteintes hépatiques suffisamment avancées. De plus, malgré la conservation synténique des miARNs, le système immunitaire des rongeurs étant sensiblement différent à celui de l'Homme, il est difficile de comparer la réponse immuno-inflammatoire des 2 espèces, et par extension de comparer les taux de miARNs mis en jeu lors de ces processus.

Après s'être assuré que nos miARNs candidats avaient les caractéristiques nécessaires d'un marqueur circulant (quantification extracellulaire significative *in vitro* et quantification dans le sang périphérique significative *in vivo*), nous avons évalué leur intérêt comme outil prédictif dans la MAF chez l'Homme.

Ainsi, nous avons recruté 165 sujets, répartis en 3 groupes afin de comparer les taux de miARNs circulants dans un groupe de témoins sains sans hépatopathies ni TUA, chez les patients présentant une MAF et chez des patients présentant un CHC lié à l'alcool. Nos données montrent tout d'abord que chacun des miARNs candidats sélectionnés sont retrouvés dans le sérum, et donc que ces miARNs pourraient servir de biomarqueurs circulants. La comparaison des taux de miARNs entre les témoins sains et l'ensemble des patients (MAF avec ou sans CHC) montre l'intérêt de l'ensemble de nos 5 miARNs candidats. De plus, lorsque l'on compare les patients CHC aux patients MAF, les miR-122 et miR-155 apparaissent significativement augmentés parmi les cas de CHC liés à l'alcool. A partir de ces données nous avons pu établir des concentrations seuils de miARNs permettant de discriminer les patients du groupe CHC et du groupe MAF sans CHC.

Malgré la pléiotropie des miARNs, nous avons montré que l'utilisation de combinaisons de miARNs impliqués dans différentes voies physiopathologiques de la MAF améliore les valeurs prédictives de notre test, et de son probable intérêt dans le suivi de la trajectoire de la MAF.

Ainsi, dans un contexte clinico-biologique de MAF documentée, la combinaison entre le miR-122 et le miR-155 semble la plus prometteuse dans le repérage précoce des cas de CHC.

5. Perspectives

Afin de répondre aux limites de notre modèle *in vitro* d'exposition chronique à de l'alcool, et notamment la réduction des communications intercellulaires, deux stratégies nous semblent d'intérêt quant à l'étude de la production et de la sécrétion de miARNs suite à une exposition chronique à l'alcool. La première est un modèle *in vitro* d'organoïde, c'est-à-dire la culture d'un organe artificiel microscopique à partir de cellules souches. Ce modèle de culture 3D peut être adapté en co-culture afin d'étudier les interactions entre les hépatocytes ainsi qu'avec d'autres cellules du foie. Une seconde perspective serait l'utilisation d'une méthodologie *ex vivo* comme les *precision-cut liver slices*. Cette méthodologie nous permet de cultiver des tranches de foie (malade ou non) sur une courte période de temps mais en ayant l'avantage d'être représentatif de l'organe en gardant à la fois sa structure et sa composition cellulaire.

Pour ce qui est de notre modèle *in vivo*, la résistance des rongeurs à la MAF est une limite qui ne nous permet pas d'obtenir des atteintes hépatiques suffisamment avancées. Afin de s'y soustraire, nous proposons l'utilisation d'un modèle de xénogreffe. Dans ce protocole les souris immunodéprimées recevraient 10 millions de cellules cancéreuses Huh-7 en injection sous-cutanée, puis seraient exposées chroniquement à des injections par gavage d'éthanol. Ce modèle intégré permettrait d'étudier la sécrétion de miARNs par les cellules cancéreuses suite à une exposition chronique à l'alcool.

Dans l'objectif de confirmer l'utilité des miARNs dans le suivi de la MAF, une étude prospective permettant un suivi longitudinal de patients souffrant de MAF de stades précoces à avancés est nécessaire. Cette étude permettrait l'obtention de données sur les taux de miARNs en fonction de données clinico-biologiques précises (stade de la stéatose, fibrose de F0 à F4, présence d'hépatite ou de CHC). De plus, une telle étude permettrait de répondre à certaines limites de notre travail, en recrutant notamment des sujets ayant une consommation d'alcool appariée aux patients du groupe MAF mais ne présentant pas d'atteintes hépatiques. Enfin, d'autres marqueurs, que ce soient des miARNs ou d'autres données clinico-biologique objectives, devraient compléter le panel de miARNs candidats proposé ici.

Annexes



Ethanol (EtOH)-Related Behaviors in α -Synuclein Mutant Mice and Association of *SNCA* SNPs with Anxiety in EtOH-Dependent Patients

Wolfgang Persyn*, Hakim Houchi*, Charles-Antoine Papillon*, Margaret Martinetti , Johann Antol, Cyrille Guillaumont, Alain Dervaux , and Mickael Naassila 

Background: Data have shown a role of α -synuclein in anxiety and also in addiction, particularly in alcohol use disorders (AUD). Since the comorbidity between AUD and anxiety is very high and because anxiety is an important factor in ethanol (EtOH) relapse, the aim of the present study was to investigate the role of α -synuclein in moderating EtOH intake, the anxiolytic effects of EtOH, and EtOH withdrawal-induced anxiety and convulsions in mice. The study aimed to determine whether *SNCA* variants moderated anxiety in EtOH-dependent patients.

Methods: We analyzed the moderator effect of 3 *SNCA* Tag-single nucleotide polymorphisms (Tag-SNPs) rs356200, rs356219, and rs2119787 on the anxiety symptoms in 128 EtOH-dependent patients. We used the C57BL/6JOLA-Hsd *Snc*a mutant mice to assess EtOH intake; sensitivity to the anxiolytic effects of EtOH in a test battery comprising the open field, the light-dark box, and the elevated plus maze; and both anxiety and convulsions induced by EtOH withdrawal.

Results: Our results demonstrated a reduction in both EtOH intake and preference and also a lack of sensitivity to the anxiolytic effects of EtOH in α -synuclein mutant mice. Results on anxiety-like behavior were mixed, but mutant mice displayed increased anxiety when exposed to a low anxiogenic environment. Mutant mice also displayed an increase in handling-induced convulsion scores during withdrawal after EtOH inhalation, but did not differ in terms of EtOH withdrawal-induced anxiety. In humans, we found a significant association of the rs356219 SNP with a high level of anxiety (Beck Anxiety Inventory score >15) and the rs356200 SNP with a positive familial history of AUD.

Conclusions: Our translational study highlights a significant role of α -synuclein in components of AUD.

Key Words: Ethanol, *Snc*a, α -Synuclein, Mice, Anxiety, Addiction.

ALCOHOL USE DISORDER (AUD) is a chronic disorder characterized by the loss of control over ethanol (EtOH) intake, compulsive use of EtOH, and development of a negative emotional state during EtOH withdrawal. A growing body of evidence suggests that α -synuclein might play a role in AUD, and a genomewide association study identified *SNCA* as the most important candidate gene for

alcohol addiction (Levey et al., 2014). α -Synuclein is a soluble synaptic protein that has been shown to negatively regulate the function of dopaminergic neurons and, thus, may participate in the regulation of EtOH reward mechanisms mediated by the mesocorticolimbic dopaminergic system. The regulation of dopaminergic transmission by α -synuclein occurs through its action on synaptic vesicular transport and dopamine transporter (Abeliovich et al., 2000; Wersinger and Sidhu, 2003). Regarding reinforcement, α -synuclein knockout mice display an altered rate of intracranial self-stimulation of medial forebrain bundle (Oksman et al., 2006).

Because of the role of dopamine in the different processes of AUD and the interactions of α -synuclein with the dopaminergic transmission, numerous studies have demonstrated a role of α -synuclein in the pathophysiology of AUD (for review, see Janeczek and Lewohl, 2013).

Numerous studies have shown changes in α -synuclein expression after EtOH exposure. In both human and animal studies, EtOH exposure has been shown to up-regulate α -synuclein expression. Increase in α -synuclein expression has been demonstrated in EtOH-consuming primates (Walker and Grant, 2006) (3-fold increase) and also in mice 48 hours following withdrawal from chronic EtOH intake (Ziolkowska et al., 2008). In human studies, serum levels of

From the Research Group on Alcohol & Pharmacodependences (GRAP), Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS) (WP, HH, C-AP, MM, JA, CG, AD, MN), INSERM U1247, University of Picardie Jules Verne, Amiens, France; Unité d'alcoologie SESAME (WP, CG), Centre hospitalier Psychiatrique Philippe Pinel, Amiens, France; Department of Psychology (MM), The College of New Jersey, Ewing, New Jersey; and CHU Sud (AD), Service de consultations de Psychiatrie et Addictologie, Amiens Cedex, France.

Received for publication March 31, 2018; accepted August 10, 2018.

Reprint requests: Mickael Naassila, Research Group on Alcohol & Pharmacodependences (GRAP), INSERM U1247, Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), University of Picardie Jules Verne, Chemin du Thil, 80025 Amiens cedex 1, France; Tel.: 33 3 22 82 76 72; Fax: 03 22 82 53 99; E-mail: mickael.naassila@inserm.fr

*These authors contributed equally to the work.

© 2018 by the Research Society on Alcoholism.

DOI: 10.1111/acer.13875

Alcohol Clin Exp Res, Vol **, No *, 2018; pp 1–14

1

α -synuclein mRNA and protein are increased in both active drinkers and those in acute withdrawal, and these levels are correlated with craving (Bönsch et al., 2005a, 2004; but see Janeczek et al., 2014).

Data from genetic studies have suggested that α -synuclein could be involved in the vulnerability to AUD. Previous studies in EtOH-preferring rats have identified *Snca* gene encoding α -synuclein as a candidate gene for EtOH consumption (Carr et al., 2007; Liang et al., 2003). Rats selectively bred for high EtOH preference display a 2-fold increase in the expression of α -synuclein in the hippocampus and caudate-putamen, and a decrease in the striatum compared to their nonpreferring counterparts. Another study used a strategy comparing EtOH-naïve inbred EtOH-preferring rats with congenic rats in which the EtOH-preferring QTL on chromosome 4, containing the *Snca* gene was replaced by the equivalent QTL from the inbred nonpreferring rat line (Liang et al., 2010); they observed a lower basal α -synuclein expression in the frontal cortex. In humans, *SNCA* has also been identified as a candidate gene associated with craving and EtOH dependence (Bönsch et al., 2005b; Foroud et al., 2007). A recent study using a translational convergent functional genomics approach elegantly demonstrated that *SNCA* is the top candidate gene for AUD (Levey et al., 2014). The *SNCA* gene is highly polymorphic, and polymorphisms have been associated with EtOH use phenotypes with 8 single nucleotide polymorphisms (SNPs) distributed in the 5' and 3' ends of the gene found to be associated with a subpopulation of EtOH-dependent individuals (42%) who experienced craving (Foroud et al., 2007). A haplotype block consisting of 6 SNPs (rs2736990, rs356168, rs356200, rs7684318, rs356221, and rs356219) was overtransmitted to alcohol cravers, and the complementary haplotype block was overtransmitted to noncravers (Foroud et al., 2007). An additional SNP, rs2736995, was also found to be associated with EtOH craving in this same study (Foroud et al., 2007). Of particular interest are polymorphisms in the promoter region and 3'-UTR that have the potential to influence expression of the gene (Chen et al., 2008; Georges et al., 2007). The A (rs356219) and T (rs356221) alleles have been shown to be "risk" alleles for EtOH misuse (Janeczek et al., 2015). The same study showed that the G (rs356219) and A (rs356221) alleles that make up the G-A haplotype are both "protective" alleles, and the frequencies of both these alleles were lower in those abusing EtOH.

Several studies have implicated α -synuclein in anxiety and depression. For example, Levey and colleagues (2014) suggested an overlap between top candidate genes such as *SNCA* and top candidate genes for clinical comorbidities such as anxiety. A previous study in female rats demonstrated that overexpression of human α -synuclein in dopaminergic neurons from the substantia nigra induces depressive-like behaviors associated with HPA axis hyperactivation (Caudal et al., 2015). There is a high comorbidity

between anxiety disorders in patients with Parkinson's disease (Richard, 2005) and AUD (Morris et al., 2005). A link between α -synuclein and anxiety was also implicated in a previous study showing that the *Snca* mutation (related to early-onset Parkinson's disease), A53T, reduced anxiety-related behavior in mice evaluated in the elevated plus maze (George et al., 2008). In rats with high levels of innate anxiety, the levels of α -synuclein expression are increased in hippocampus (Chiavegatto et al., 2009). In contrast, 2 other studies (Peña-Oliver et al., 2010; Siegmund et al., 2005) using α -synuclein mutant mice did not find any difference in anxiety-like behaviors evaluated using different emotionality tests (i.e., the open field, elevated plus maze, and light-dark box). Thus, even though some evidence suggests a role for α -synuclein in anxiety disorders, the evidence to date is still inconclusive and its role in the anxiolytic effects of EtOH is unknown.

In summary, all the available data demonstrate a role of α -synuclein in AUD and in anxiety, but the role of α -synuclein in the anxiolytic effects of EtOH and in EtOH-related behaviors, such as withdrawal, remains unknown. An individual's susceptibility to AUD may be determined by genes influencing their acute sensitivity to EtOH-induced anxiolysis. The aim of the present study was to explore the role of α -synuclein in EtOH intake, EtOH withdrawal, and the anxiolytic effects of EtOH using the C57BL/6JOLA Hsd *Snca* mutant mice. We used C57BL/6J control mice as described in another study (Peña-Oliver et al., 2014). We also investigated in 128 EtOH-dependent patients the association between 3 Tag-SNPs of the *SNCA* gene (rs356200, rs356219, and rs2119787) and the levels of anxiety during withdrawal, the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) score, and the family history of AUD.

MATERIALS AND METHODS

Drugs

EtOH (96%, v/v), obtained from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France), was diluted to 20% (v/v) in saline solution 0.9%. All injections were made via the intraperitoneal route in volumes of 1.25 ml per 100 g of body weight. Quinine hydrochloride and sucrose were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and diluted in tap water.

Animals

C57BL/6JOLA Hsd and C57BL/6J Rcc Hsd male mice were obtained from Harlan Laboratories (Gannat, France) and used at 8 weeks of age after 1 week of habituation in our animal care unit. Five cohorts of mice were used in different experimental procedures (see Fig. 1 for a timeline of the experimental procedures). Mice were housed in a room with a controlled light-dark period (lights off at 07:00 PM). The number of animals was kept to a minimum, and all efforts were made to limit stress and avoid animal suffering. Experiments comply with both the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals (NIH), the European Community regulations for animal use in research (CEE No 86/609), and our local ethics committee C.R.E.M.E.A.P. (Comité Régional d'Éthique en Matière d'Expérimentation Animale de Picardie).

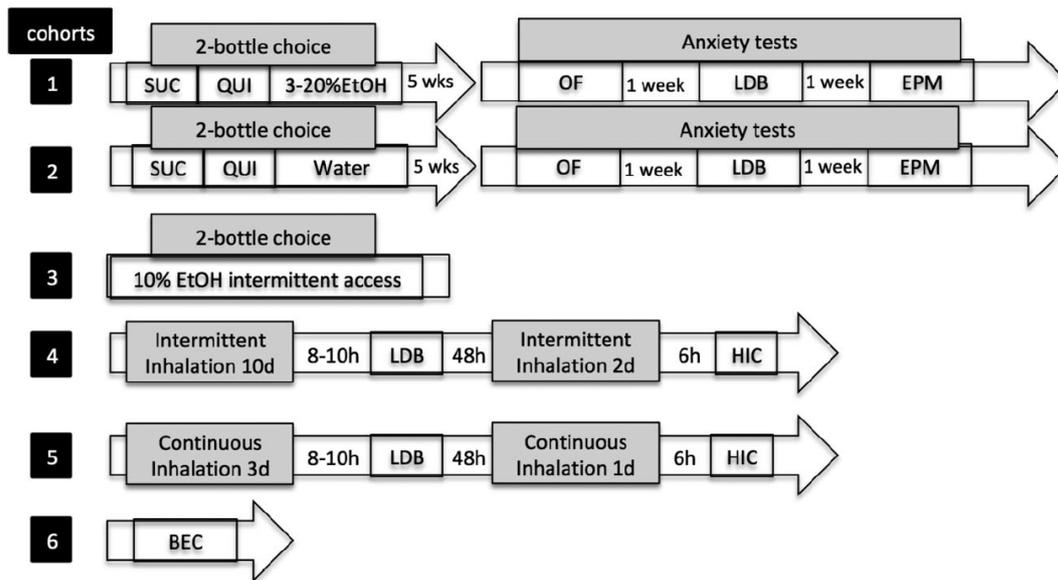


Fig. 1. Timeline of the experimental procedures. A first cohort of mice ($n = 35$ controls and $n = 34$ mutants) was submitted to 2-bottle choice experiments. A second cohort of 20 mice (10 control and 10 mutant mice) was tested in anxiety tests without any EtOH drinking exposure and was also used at the end for the EtOH uptake (blood EtOH) experiment. A third cohort of 40 mice (20 control and 20 mutant mice) was used in a 10% EtOH intermittent access 2-bottle choice paradigm. Two other cohorts (27 control and 34 mutant mice) were exposed to continuous (11 control and 14 mutant mice) or intermittent (16 control and 20 mutant mice) EtOH vapor and tested for anxiety and HIC during withdrawal. A sixth cohort was used for EtOH metabolism (6 control and 6 mutant mice). SUC, sucrose; QUI, quinine; EtOH, ethanol; OF, open field; LDB, light-dark box; EPM, elevated plus maze; BEC, blood EtOH concentration; HIC, handling-induced convulsions.

Drinking Experiments

In the first (34 mutant and 35 control mice) and second (10 mutant and 10 control mice) cohorts, mice were individually housed for 2 weeks before the 2-bottle choice procedure began. Mice received four 24-hour consecutive sessions (Monday to Thursday) of free access to 2-bottle choice (0.5% sucrose and water) the first week and to 2-bottle choice (1% sucrose and water) the second week. The 2 following weeks quinine (0.03 and 0.1 mM) intake was measured as done for sucrose. Concentrations were chosen based on our previous work (Legastelois et al., 2014). Data are presented as the mean of the 4 days for each concentration in order to calculate the mean for control and mutant groups. Thereafter, mice of the first cohort were tested for 8 weeks for their EtOH intake while those of the second cohort had access to 2 bottles of water. The second cohort consisted of EtOH-naïve mice (10 mutant mice and 10 control mice) to measure the difference in anxiety-like behavior independent of EtOH history between the 2 strains. Two days after the last anxiety test, mice of the second cohort were used to measure blood EtOH levels after an acute EtOH injection, as described below. In the first cohort, mice were exposed to a continuous 2-bottle choice paradigm ($N = 69$, 35 controls and 34 mutant mice; 1 mutant mouse died a few days after arrival in the animal care unit) with free access to tap water and a 3, 6, 9, 12, 15, or 20% EtOH solution. Mice received seven 24-hour consecutive sessions (Monday to Sunday), and the EtOH concentration (v/v) was increased every week. Fluid intake (g/kg body weight/24 h), preference (EtOH intake/total fluid intake), and body weight were measured. Data are presented as the mean of the 7 days for each EtOH concentration in order to calculate the mean for control and mutant groups. The placement of each solution was alternated after each

volumetric measurement to control for side preference. Fluid consumption volumes were recorded in the morning, and individual levels of fluid intake or preference were obtained by calculating the mean values from 6 consecutive days. During all drinking experiments, 6 to 8 “dummy” bottles were used to estimate liquid spillage due to mice activity and bottle manipulation. After 5 weeks, mice of both cohorts were submitted to the anxiety tests every other week in the following sequence: open field, light-dark box, and elevated plus maze. Importantly, mice of the second cohort were exposed to the same procedure as the first cohort, as they also had access to 2-bottle choice of water during the same period of the EtOH 2-bottle choice in the first cohort. Bottles of water were manipulated, and mice were weighed for the second cohort as done for the first cohort. Thus, there was no difference between the 2 cohorts that could have an impact on the anxiety measures.

A third cohort of mice (20 control and 20 mutant mice) was used to measure 10% EtOH intake and preference in an intermittent 2-bottle choice paradigm that is known to facilitate EtOH intake. Mice were individually housed for 1 week before the 2-bottle choice experiment. Thereafter, access to a 10% EtOH bottle was available 3 days each week (Monday, Wednesday, and Friday) for a total of 20 sessions, while a bottle of tap water was always available.

Two other cohorts (fourth and fifth) were used in an EtOH inhalation procedure to measure EtOH withdrawal-induced anxiety and handling-induced convulsions (HIC).

During the course of the study, a few mice died at different stages, thus explaining the different numbers of animal used between groups. The number of animals used in each experiment is indicated in the legends of the figures.

Finally, a sixth cohort of 12 animals (6 control and 6 mutant mice) was used to measure blood EtOH concentrations (BECs) 5 and 15 minutes after 1.5 g/kg EtOH injection.

Anxiety-Like Behaviors

Anxiety-like behaviors were evaluated in the open field, the elevated plus maze, and the light–dark box. During the elevated plus maze and light–dark box tests, a mouse was considered to have visited the anxiogenic/unprotected area when all 4 paws were on an open arm or in the light area, respectively. Mice were placed in the test room 12 hours before the test for habituation to the environment and to limit the potential stress induced by the novelty. To test the sensitivity to the anxiolytic effects of EtOH, mice were injected with EtOH immediately before placing them in the maze. In the first experiment with the open field, mice injected with the 2.0 g/kg dose of EtOH displayed a clear sedation and thus we used lower doses in the other tests (1.0 to 1.5 g/kg).

Open Field

The apparatus consisted of a black opaque floor 40-cm square, entirely surrounded by opaque acrylic walls of 40 cm height transected with infrared photocell beams 2 cm above the floor at 16 sites along each side. Mice were placed in the center of the open field apparatus immediately after either saline or EtOH injection and allowed to freely explore the arena for a period of 5 minutes. The test room was shielded from external noise and equipped with a ventilation system, which served to create the same white noise as the housing room of the animal care unit. Locomotor chambers were illuminated with indirect white light (200 lux at the center of the arena). Horizontal locomotion was measured from photocell beam interruptions using ActiTrack software (Bioseb, Vitrolles, France). Measures taken were the % of time spent in the inner/unprotected zone (the middle 8 squares not in proximity to the walls vs. outer 16 squares for the periphery zone) and the total traveled distance (cm).

Light–Dark Box

The light–dark box apparatus consisted of 2 equal rectangular compartments (40 × 20 cm) connected by a door. One compartment was white and illuminated (200 lux at the center of the arena), and the other was black and dark (10 lux). Mice were placed gently in the center of the dark area facing the door. The animal was initially exposed to the dark area in order to avoid intense freezing response (rather than a reduction in emotionality) that could be observed in the illuminated area (Peña-Oliver et al., 2010). For the following 5 minutes, the latency to the first entry in the light area, the number of entries, and the percentage of time spent in the light area were scored.

Elevated Plus Maze

The elevated plus maze apparatus consisted of 2 enclosed (50 cm long × 10 cm large × 7.5 cm high) and 2 open (50 × 10 cm) arms that extended from a common central platform (10 × 10 cm) under 200 lux lighting (center of the maze). Mice were placed gently into the maze center facing one of the open arms. For the following 5 minutes, the latency to the first entry in the open arms, the percentage of open arm entries, and the percentage of time spent in open arms were scored.

EtOH Vapor Exposure, Light–Dark Box and HIC Experiments

Mice were collectively housed (10 per cage) in pressured and ventilated chambers in an enriched environment (activity wheel and shelter), and ad libitum access to water and food was provided, as

previously described (Alaux-Cantin et al., 2015; Simon O'Brien et al., 2011). Briefly, EtOH vapor was generated by introducing pressured air into a 96% EtOH reservoir (60 to 80% of hygrometry) and the EtOH concentration in the air was increased to reach stable BEC (between 150 and 250 mg/dl). EtOH vapor exposure was either intermittent (third cohort: 11 control and 14 mutant mice) or continuous (fourth cohort: 16 control and 20 mutant mice). The chronic intermittent EtOH vapor exposure (daily exposure to EtOH vapor for 12 hours from 09:00 PM to 09:00 AM) was conducted for 10 days; in the continuous paradigm, mice were exposed to EtOH vapor 24 h/d for 3 days. BECs were measured during the intermittent (at the first, third, sixth, and ninth day of exposure) and continuous (second and third day of exposure) protocols, then after 6 hours of EtOH withdrawal.

Light–dark box experiments were carried out as described above, but the light compartment was illuminated at 100 lux at the center of the arena to avoid a ceiling effect that may be due to a hyperanxious state induced by EtOH withdrawal. An evaluation of withdrawal seizures was done after a second EtOH vapor inhalation exposure using the HIC protocol 6 hours after the end of EtOH exposure. In both paradigms, for the second cycle of EtOH vapor exposure (intermittent: 12 hours a day for 2 days and continuous for 1 day), mice were exposed to EtOH the same number of hours (24 hours). Mice were observed for spontaneous convulsions, which garnered an HIC score of 4. If mice convulsed after being suspended by the tail, the HIC score was 3. Convulsions observed after a gentle spin of 180 or 360° produced scores of 2 and 1, respectively. If no convulsions were observed, the HIC score was 0.

Blood EtOH Concentrations

In a sixth cohort, mice (6 control and 6 mutant mice) blood was collected 5 and 15 minutes after injection of 1.5 g/kg EtOH. Blood samples from the sixth cohort and also from mice exposed to EtOH inhalation were collected from the retro-orbital sinus at different time points. BECs were measured using the AM1 Alcohol Analyser (Analox Instruments, IMLAB, Lille, France). The precision of this assay is 1 to 2%, sensitivity is 0.1 mg/100 ml, and the curve is linear up to 400 mg/100 ml.

SNP Analysis in EtOH-Dependent Patients

EtOH-dependent patients ($N = 128$) were recruited from the inpatient wards of the SESAME alcoholology unit at the Philippe Pinel Psychiatric Hospital (Amiens, France). Patients were between 20 and 60 years of age (mean age 41.7 ± 0.9 , male gender ratio 77%). All patients were Caucasian. All patients completed medically assisted withdrawal for 1 week and provided written informed consent prior to data collection in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the institutional review board at Amiens University Hospital (Comité de Protection des Personnes Nord Ouest II) and conducted in compliance with the French Huriet–Séruslat law on medical research. Key exclusion criteria were underage, pregnancy, lack of EtOH dependence, substance use disorders (except for nicotine), patients under tutorship or guardianship or placed in the custody of the court, and lack of consent.

Diagnostic Instruments

Anxiety was measured using the Beck Anxiety Inventory (BAI) (Beck et al., 1988). Participants also completed a homemade Life Events Questionnaire. The participants were asked to complete the AUDIT (Saunders et al., 1993), a self-report questionnaire used in healthcare to identify individuals with hazardous and harmful patterns of alcohol consumption (Babor et al., 2001). It consists of 10 questions with a 5- and 3-point response format. The response is

scored to give a total AUDIT score ranging from 0 to 40. According to the World Health Organization, an AUDIT score of ≥ 16 or above represents a high level of alcohol problems, whereas an AUDIT score of ≤ 1 is reported by alcohol abstainers (Babor et al., 2001). Alcohol dependence diagnosis was done according to the DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994). Family history of alcoholism was assessed with the following screening question: "Has your mother or father ever had any family, job, school, police, or health problems because of drinking?" (Rice et al., 1995). Family history of alcoholism was also corroborated by the declaration of other members of the family.

Genotyping and DNA Preparation

Standard procedures were followed in relation to genomic DNA preparations from whole blood. Genotyping of *SNCA* rs2119787, rs356219, and rs356200 was performed with Applied Biosystems TaqMan® Genotyping Assay with the use of an Applied Biosystems StepOne Fast Real-Time PCR system. Instructions of the manufacturer were followed as necessary (<http://www.appliedbiosystems.com>).

Statistical Analysis

All data analyses were conducted using SigmaStat11.0 software (LogiLabo, Paris, France). The intake data were analyzed by a 2-way mixed analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc tests with genotype as the between-subjects factor and concentration as the within-subjects factor. Data from anxiety tests carried out on EtOH-naïve animals were analyzed by an unpaired Student's *t*-test. Data from other experiments were analyzed by a 2-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests with mouse strain (mutant vs. control) as the between-subjects factor and EtOH dose as the within-subjects factor. Data from the light-dark box (latency and number of entries in light) and from the elevated plus maze (% time in open arms) that were not normally distributed (according to the Kolmogorov-Smirnov test) and did not meet the requirements of homogeneity of variance were submitted to a square-root-transformation. Data from the intermittent 10% EtOH access were analyzed by a Mann-Whitney rank-sum test followed by an unpaired *t*-test. Data on EtOH uptake (ascending limb of the BEC curve) were analyzed with independent-samples Student's *t*-tests.

Genotypic and allele frequencies were calculated by gene simple counting method. A chi-square test was used to determine whether the genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). To avoid the risk of technical mistake, 10% of the population was re-genotyped, but no mismatches were observed. For statistical analyses, chi-square, Fisher's exact test, or G tests were used when appropriate and also to evaluate the differences in genotypic and allelic distributions between the groups. Independent-samples *t*-tests were used to evaluate the differences in demographic data. We adopted a significance level of $p < 0.05$ and odds ratio (OR) at 95% confidence interval (CI).

RESULTS

Taste Perception

As shown in Fig. 2A, mutant mice did not differ from control mice in sucrose preference, Strain: $F(1, 87) = 0.74$, $p > 0.05$; Concentration: $F(1, 87) = 0.31$, $p > 0.05$; Strain \times Concentration: $F(1, 87) = 0.04$, $p > 0.05$. However, mutant mice displayed a decrease in quinine preference at the highest concentration, Strain: $F(1, 87) = 6.84$,

$p < 0.01$; Concentration: $F(1, 87) = 341.66$, $p < 0.001$; Strain \times Concentration: $F(1, 87) = 3.18$, $p > 0.05$ (Fig. 2B). Quinine preference was decreased (-18%) in mutant mice compared to control mice at the 0.1 mM concentration ($p < 0.005$). There was no difference in the evolution of body weight (Fig. 2C). We measured BEC 5 and 15 minutes after injection of 1.5 g/kg EtOH in both strains to explore difference in EtOH uptake. There was no statistically significant difference between the 2 strains after either 5 minutes ($U = 7,000$, $n = 6$ mutants and 6 controls, $p > 0.05$) or 15 minutes ($U = 16,000$, $p > 0.05$) (Fig. 2F). Since a clear sedation was induced by this 2.0 g/kg dose, lower doses were used in the subsequent tests.

EtOH Intake and Preference

Mutant mice showed a reduction in EtOH intake compared to control mice when exposed to ascending concentrations of an EtOH solution (3, 6, 9, 12, 15, and 20%), Strain: $F(1, 87) = 3.84$, $p < 0.05$; Concentration: $F(5, 335) = 179.15$, $p < 0.001$; Strain \times Concentration: $F(5, 335) = 2.76$, $p < 0.05$. As shown in Fig. 2D,E, mutant mice drank significantly less EtOH than control mice at both 15% (Tukey's test, $p < 0.05$) and 20% (Tukey's test, $p < 0.001$). Further, Cohen's effect size value ($d = 0.75$) suggested a high significance of the 2.88 g/kg difference (24% decrease) in EtOH intake at the 20% concentration between the 2 groups. Mutant mice also displayed a reduction in EtOH preference compared to control mice, Strain: $F(1, 87) = 4.20$, $p < 0.05$; Concentration: $F(5, 335) = 42.41$, $p < 0.001$; Strain \times Concentration: $F(5, 335) = 0.84$, $p > 0.05$. As shown in Fig. 2E, preference was significantly decreased in mutant mice at 6, 9, 15, and 20% (Tukey's test, $p < 0.05$).

In the 10% EtOH intermittent access experiment (see Fig. 3A), we observed a significant reduction in EtOH consumption in mutant mice compared to controls (average intake in controls: 17.94 g of pure EtOH/kg of body weight/d and in mutants: 14.43; $t = 3.118$, $df = 38$, $p < 0.005$). We also observed a significant reduction in alcohol preference in mutant mice compared to controls after the 10th session (59.5% vs. 47.7%; $t = 3.316$, $df = 38$, $p < 0.005$) (Fig. 3B). Regarding the body weight, a difference was observed at the second week ($U = 114,500$, $n = 20$, $p < 0.05$), but not during the rest of the protocol ($U = 148,000$, $n = 20$, $p > 0.05$) (Fig. 3C).

Anxiety Tests in EtOH-Naïve Mice

As shown in Fig. 4, there was no significant difference either in the open field test (Fig. 4A,B) or in the elevated plus maze test (Fig. 4F-H) between control and mutant mice. In the light-dark box, mutant mice displayed significantly less anxiety-like behavior regarding both the latency ($t = 3.44$, $df = 14$, $p < 0.005$) and the number of entries ($t = 2.73$, $df = 14$, $p < 0.05$) in the light compartment (Fig. 4C-E).

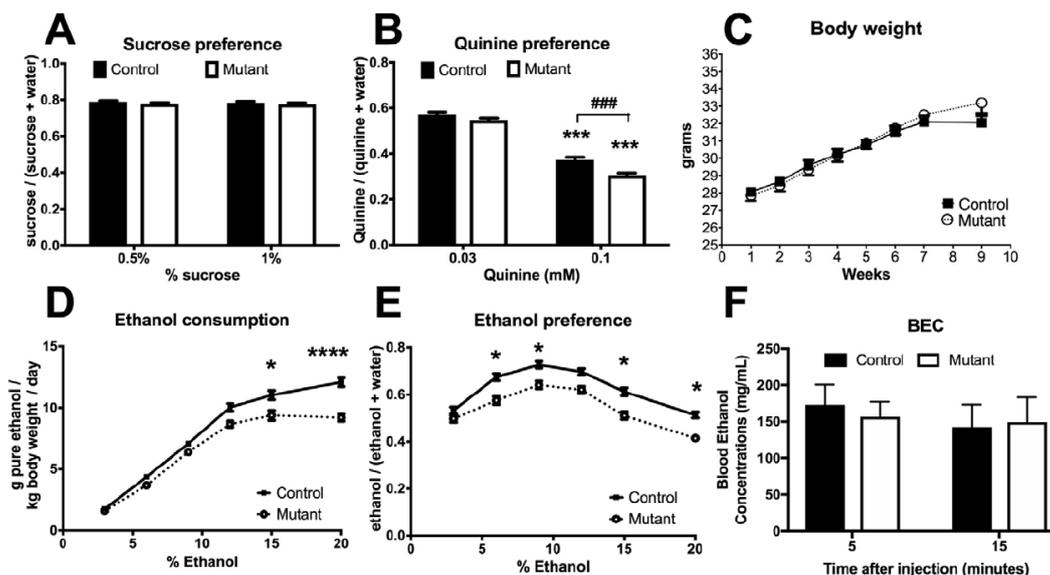


Fig. 2. Sucrose and quinine preference, body weight, ethanol (EtOH) intake and preference, and EtOH uptake (blood EtOH level). Mice ($n = 44$) and control mice ($n = 45$) of the first and second cohort were tested for sucrose (0.5 and 1.0%) preference (A) and quinine (0.03 and 0.1 mM) preference (B). Body weight evolution in mice from the cohort 1 (C). Ethanol (3 to 20%) intake (D, g/kg/24 h) and preference for EtOH (E) measured in the cohort 1 ($n = 34$) and control mice ($n = 35$). Blood EtOH concentrations measured after 5 and 15 minutes of 1.5 g/kg EtOH injection in mice (sixth cohort) that were naïve from EtOH and behavioral tests ($n = 6$ per group) (F). * $p < 0.05$ and **** $p < 0.001$ versus respective EtOH percentage in mutant mice. *** $p < 0.005$ versus respective strain at the 0.03 mM concentration of quinine, ### $p < 0.005$.

EtOH-Induced Anxiolytic Effects After EtOH Drinking in the 2-Bottle Choice Paradigm

Open Field Test. As shown in Fig. 5A, there was a main effect of strain on the percentage of time spent in the inner zone during the 5-minute exposure to the test, Strain: $F(1, 35) = 5.11$, $p < 0.05$, and a significant interaction, Strain \times Concentration: $F(1, 35) = 3.44$, $p < 0.05$. Tukey's post hoc analysis indicated a significant effect of EtOH in the control mice ($p < 0.05$) and a difference between strains in the EtOH-treated groups ($p < 0.01$), thus revealing that only control mice were sensitive to the anxiolytic effects of EtOH (2 g/kg). In addition, EtOH injection decreased locomotor activity in both groups (main effect of EtOH treatment: treatment: $F(1, 38) = 16.79$, $p < 0.001$, with no significant difference between strains (Fig. 5B). There was no strain difference in the saline groups, showing that the mutant mice did not differ in their anxiogenic profile compared to control mice.

Light-Dark Test. Data from the light-dark box are shown in Fig. 5C-E. All of the 3 measured parameters were changed by EtOH treatment in control mice, but not in mutant mice. Regarding the latency to enter to the light compartment (Fig. 5C), a 2-way ANOVA revealed a significant difference between strains, Strain: $F(1, 41) = 4.83$, $p < 0.05$, in EtOH treatment, EtOH treatment: $F(2, 41) = 7.58$, $p < 0.005$, and the interaction between the 2 factors,

Strain \times EtOH treatment: $F(1, 41) = 2.76$, $p < 0.05$. Tukey's post hoc analysis indicated a lower latency in mutant compared to control mice ($p < 0.05$) and a significant effect of EtOH but only in the control mice at both doses (1.0 g/kg, $p < 0.001$ and 1.5 g/kg, $p < 0.001$). Control mice made more entries into the light compartment after EtOH treatment, but mutant mice were unaffected by EtOH (Fig. 5D). A 2-way ANOVA revealed a main effect of treatment, Treatment: $F(2, 41) = 18.94$, $p < 0.001$, a nonsignificant main effect of strain, Strain: $F(1, 41) = 0.24$, $p > 0.05$, and Tukey's post hoc analysis indicated a significant effect of EtOH at both doses only in the control mice (1.0 g/kg, $p < 0.05$ and 1.5 g/kg, $p < 0.001$) and a significant difference at the 1.5 g/kg dose between the 2 strains ($p < 0.05$). Concerning the time spent into the light zone (Fig. 5E), a 2-way ANOVA revealed no significant effect of strain, Strain: $F(1, 41) = 0.00$, $p > 0.05$, but a significant main effect of EtOH treatment, Treatment: $F(2, 41) = 15.03$, $p < 0.001$. Tukey's post hoc analysis indicated a significant effect of EtOH at 1.5 g/kg in control mice and at both doses in mutant mice.

Elevated Plus Maze Test. Data from the elevated plus maze are shown on Fig. 5F-H. In general, our results showed no significant difference between strains on any parameter at baseline. However, the anxiolytic effects of EtOH were observed in control mice only, thus demonstrating a lack of sensitivity of mutant mice to the anxiolytic

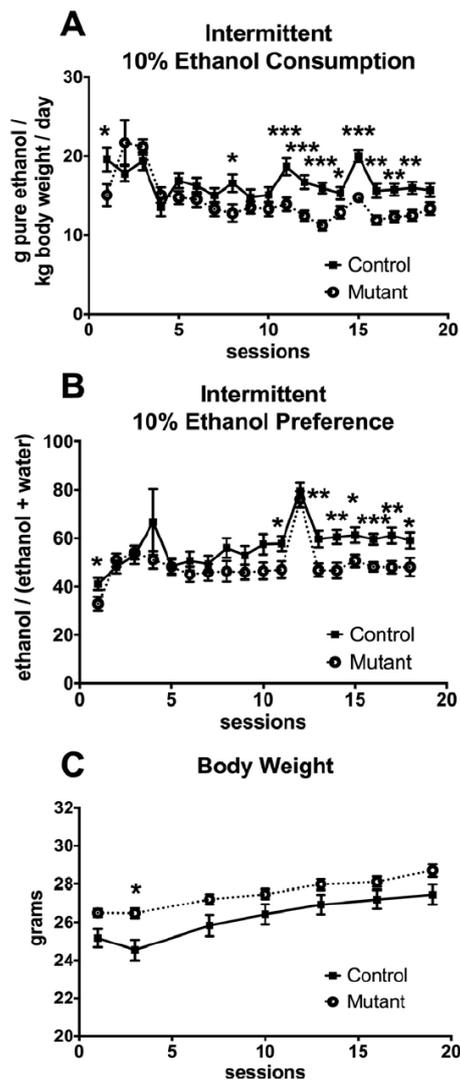


Fig. 3. Results of the 2-bottle choice 10% ethanol intermittent access in 40 mice (20 control and 20 mutant mice). Consumption (A), preference (B), and body weight (C) are reported. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus respective control group.

effects of EtOH. Regarding the % of time spent in open arms (Fig. 5F), the 2-way ANOVA revealed a significant difference between strains, Strain: $F(1, 59) = 18.72$, $p < 0.001$, in EtOH treatment, EtOH treatment: $F(2, 59) = 10.67$, $p < 0.001$, and the interaction between the 2 factors, Strain \times EtOH treatment: $F(2, 59) = 4.23$, $p < 0.05$. Tukey's post hoc analysis indicated a significant effect of EtOH at both doses in the control mice ($p < 0.001$) that was also significant compared to the respective doses in mutant mice ($p < 0.001$). The 2-way ANOVA also revealed a significant strain difference in the % of entries in open arms,

Genotype: $F(1, 59) = 6.62$, $p < 0.05$, in EtOH treatment, EtOH treatment: $F(2, 59) = 7.63$, $p < 0.001$, and the interaction between the 2 factors, Strain \times EtOH treatment: $F(2, 59) = 2.41$, $p < 0.05$ (Fig. 5G). Tukey's post hoc analysis indicated a significant effect of EtOH at both doses in the control mice (1.0 g/kg, $p < 0.05$ and 1.5 g/kg, $p < 0.001$) and a significant difference at the 1.5 g/kg dose between the 2 strains ($p < 0.05$). The 2-way ANOVA revealed a significant genotypic difference in the total number of entries, Strain: $F(1, 59) = 4.49$, $p < 0.05$, a main effect of EtOH treatment, EtOH treatment: $F(2, 59) = 12.64$, $p < 0.001$, and an interaction between the 2 factors, Strain \times EtOH treatment: $F(2, 59) = 5.02$, $p < 0.05$ (Fig. 5H). Tukey's post hoc analysis indicated a significant effect of EtOH at both doses in the control mice (1.0 g/kg, $p < 0.05$ and 1.5 g/kg, $p < 0.001$) and a significant difference at the 1.5 g/kg dose between the 2 strains ($p < 0.001$).

EtOH Withdrawal-Induced Convulsions and Anxiety

As shown in Fig. 6A, the HIC score was increased in mutant mice compared with controls ($U = 23,000$, $p < 0.005$) after intermittent exposure to EtOH vapor. BECs between control and mutant mice (at days 1, 3, 6, and 9 and at 6-hour withdrawal the last day) did not differ (Fig. 6B). The HIC score was also increased in mutant mice compared to controls after continuous exposure to EtOH vapor ($U = 25,000$, $p < 0.001$) (Fig. 6C), but there was no difference in BEC (Fig. 6D).

Anxiety-Like Behavior During EtOH Withdrawal

As shown in Fig. 7, *Snca* mutant mice displayed a greater anxiety-like behavior with a reduction in both time in light compartment ($p < 0.001$) (Fig. 7C) and number of entries ($p < 0.001$) (Fig. 7B). Following alcohol exposure, no difference in the anxiety-like behavior levels was observed except for the time in light compartment parameter during the intermittent exposure paradigm ($p < 0.05$) (Fig. 7C). It is interesting to note that we observed a significant and large increase in anxiety-like behavior of mice ($p < 0.001$ for all parameters) from both strains after withdrawal from continuous exposure compared with intermittent exposure, which showed no difference between control and mutant mice (Fig. 7A–C). Hence, we observed a significant increase in anxiety-like behavior in both strains following the continuous exposure paradigm ($p < 0.001$ in control mice for all parameters; mutant: time in light, $p < 0.005$; number of entries, $p < 0.005$; and latency, $p < 0.001$) but not following the intermittent exposure.

Human Genetics

In general, our population displayed a severe phenotype of the disease: The AUDIT score mean was 30.0 ± 0.6 , 63% displayed severe dependence, and 77.5% displayed physical

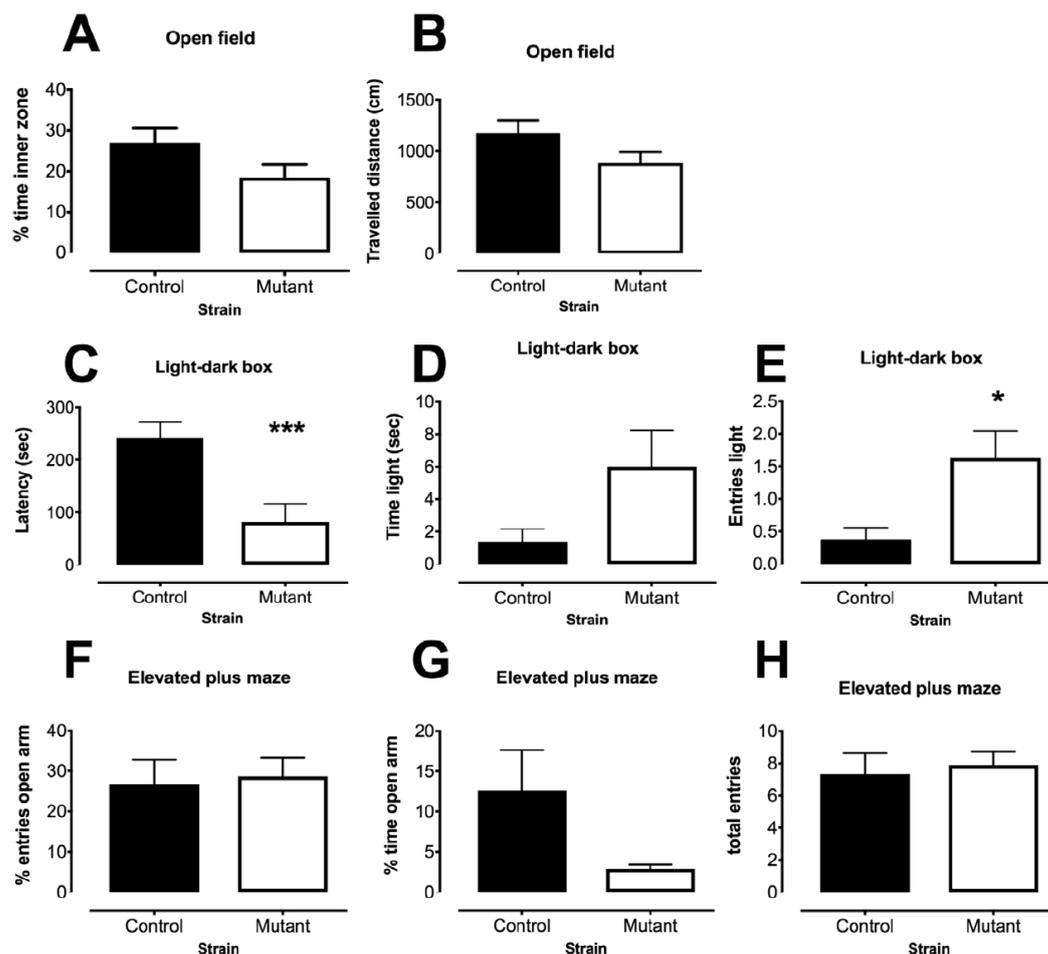


Fig. 4. Results of the anxiety tests in ethanol-naïve animals (*Snca* mutant mice [$n = 8$ to 10 per group] and control mice [$n = 8$ to 10 per group]). (A, B) Open field; (C, D, E) light-dark box; and (F, G, H) elevated plus maze. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ versus respective control group.

dependence. Thirty-two percent had been previously admitted to a psychiatric hospital, 36% had suicide attempts, 21% were in a precarious situation (job and financial situation), 78% were smokers, and 92% were depressed (moderate to severe). Eighty-eight percent were anxious, and they display a mean of BAI score of 24.4 ± 1.4 . We also found a significant correlation between BAI and AUDIT scores ($r = 0.408$; $p < 0.0001$).

Genotype significant differences in clinical characteristics and variables are presented in Table 1. All 3 SNPs genotypic distribution were in HWE (rs356219, rs356200, and rs2119787, respectively, $p = 0.990$, $p = 0.971$, $p = 0.972$). Regarding the allelic prevalence and the genotype distribution of the 3 SNPs, the respective 1-way ANOVAs did not reveal any significant difference in mean scores (AUDIT, BAI) ($p > 0.05$). Our results demonstrated an association

between the rs356219 SNP and a moderate to high level of anxiety (BAI score >15). More precisely, G carriers of the rs356219 were less likely to display high BAI scores (>15 ; OR 0.32). We also found a significant association between the rs356200 SNP and a positive familial history of AUD ($p < 0.05$).

DISCUSSION

The results from the present study demonstrated that the *Snca* mutation is associated with a decrease in the propensity to drink EtOH and an impaired sensitivity to the anxiolytic effects of EtOH in mice. Concerning the anxiogenic profile of *Snca* mutant mice, our results were mixed: Depending on the experimental conditions, we showed either no difference (when conditions were more anxiogenic) or an increase in

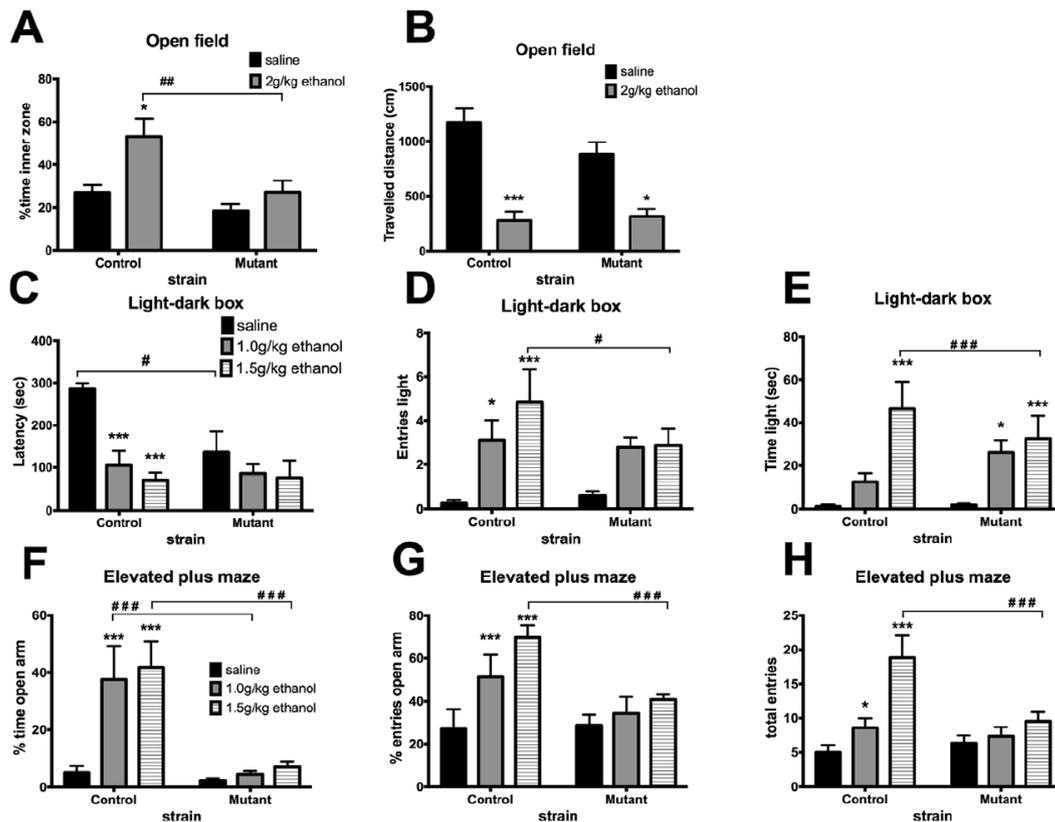


Fig. 5. Open field. The mean \pm SEM of percentage of time in inner zone (A) and traveled distance (B) for control ($n = 9$ to 11) and mutant ($n = 10$ to 11) mice after saline or 2.0 g/kg ethanol (EtOH) injections. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.005$ versus respective saline, ## $p < 0.01$ versus respective strain. Light-dark box. The mean \pm SEM of latency to enter into the light compartment (C), number of entries in the light compartment (D), and time in the illuminated compartment (E), for control ($n = 7$ to 8) and mutant ($n = 7$ to 9) mice after saline or 1.0 g/kg or 1.5 g/kg EtOH injections. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.005$ versus respective saline, # $p < 0.05$ and ### $p < 0.005$ versus respective control. Elevated plus maze testing aimed at evaluating anxiety-like behaviors showed that the percentage of time in open arm (F), the percentage of entries in open arms (G), and the total number of entries (H) are increased by EtOH treatment in control mice but not in mutant mice (control: $n = 10$ to 11, mutant $n = 11$). There is no strain difference regarding neither the basal (saline injection) levels of anxiety-like behavior nor the total locomotor activity (total entries). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ relative to control littermates and ### $p < 0.001$ versus respective EtOH dose in mutant mice.

anxiety-like behavior (when conditions are less anxiogenic). Further, we showed that mutant mice displayed higher convulsion scores during EtOH withdrawal, but no change in the level of anxiety. In humans, we found significant associations between alcohol misuse and the level of anxiety; the rs356219 SNP and a high level of anxiety; and the rs356200 SNP and a positive familial history of AUD. Overall, our results highlight a new mechanism by which α -synuclein may play a role in anxiety associated with AUD as it modulates both the anxiolytic effect of EtOH and the severity of EtOH withdrawal.

Our results showed a 25% reduction in EtOH intake and a 10% reduction in EtOH preference at the 20% EtOH concentration in α -synuclein mutant mice. Mutant mice display reduced preference at both moderate (6 to 9%) and high (15 to 20%) concentrations of EtOH solutions. Though the

reduction in EtOH intake and preference was not large, it was confirmed by our second experiment using the 10% EtOH intermittent access protocol. The insensitivity to the anxiolytic effects of EtOH could be related to the reduced propensity to drink EtOH in *SncA* mutant mice. Our results are in accordance with those of a previous study showing no modification of consumption of either 3 to 6% EtOH solution or saccharin solution (Lopez-Jimenez et al., 2013). However, the same study showed a 2-fold increase in EtOH intake at the 10% concentration in EtOH by *SncA* mutant mice, but it is important to note that they used younger mice (5- to 7-weeks old) compared with mice in our study. A recent study has shown that transgenic mice expressing human SNCA at 3- to 5-fold higher levels over the endogenous protein in neurons throughout the central nervous system display a transient reduction in 20% EtOH intake

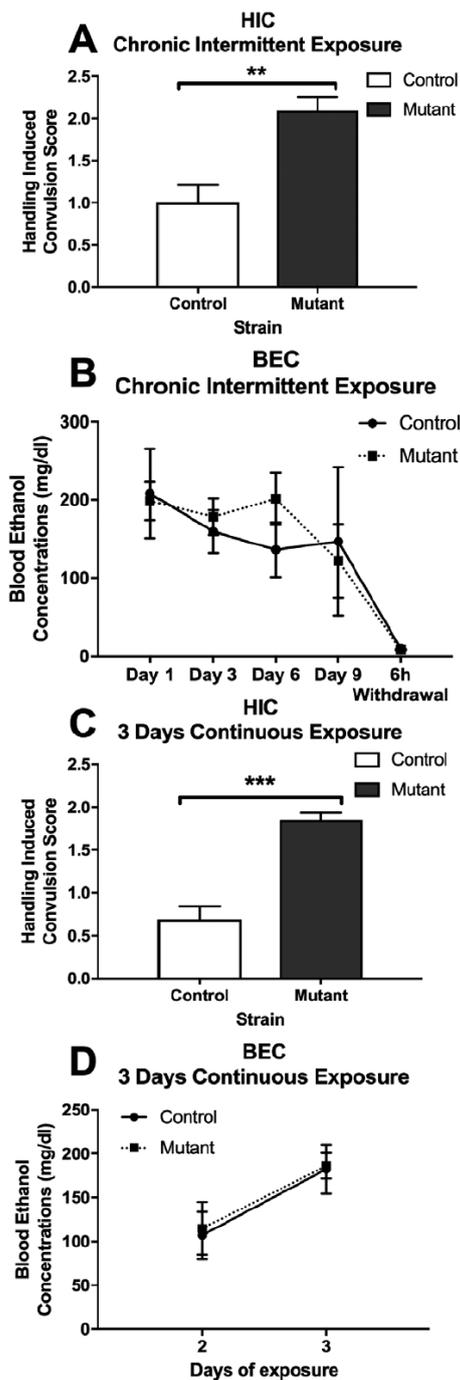


Fig. 6. Handling-induced convulsion during withdrawal after either intermittent (A) (11 control and 14 mutant mice) or continuous (C) (16 control and 20 mutant mice) exposure to ethanol (EtOH) vapor in both control and mutant mice. Blood EtOH concentrations are shown in both types of exposure: intermittent (B) and continuous (D). ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus control group.

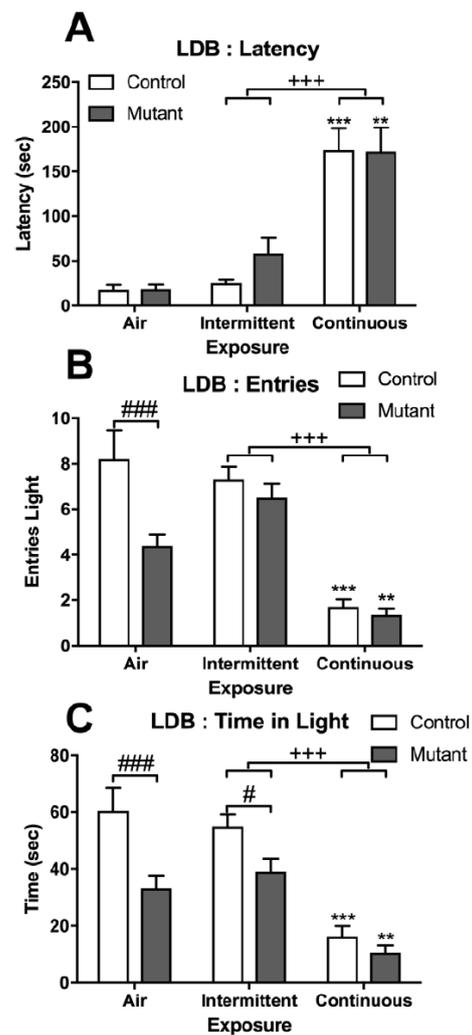


Fig. 7. Anxiety-like behavior measured in the light–dark box (LDB) test in groups of mice exposed to air (10 control and 10 mutant mice), intermittent (10 control and 8 mutant mice), or continuous (14 control and 14 mutant mice) ethanol vapor. Latency (A); number of entries in light compartment (B); and time in light compartment (C) are reported. ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ versus respective air group. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ versus respective control mice. ### $p < 0.005$ continuous versus intermittent groups, +++ $p < 0.001$.

during the first 3 days in a 2-bottle free choice drinking paradigm (30% decrease), but an increase (2-fold increase) in 10% EtOH intake in an operant paradigm (Rotermund et al., 2017). Altogether, it seems that the lack of α -synuclein decreases EtOH intake in a 2-bottle free choice paradigm, whereas its overexpression may lead to an increase in EtOH intake in an operant paradigm.

In accordance with our observed decrease in EtOH preference of *Snea* mutant mice, we also observed a decrease in

Table 1. Genotype and Allele-Wise Association Between the rs356219, the rs356200, and rs2119787 Polymorphisms of *SNCA* Gene and High Beck Anxiety Inventory (BAI) Score (>15) and Family History of Alcoholism (FHA)

rs356219	A/A		A/G		G/G		Khi2 ddl=2	Power	G-		G+		Khi2 ddl=1	Power	Odds Ratio
	n	%	n	%	n	%			n	%	n	%			
Patients	128	52	406	60	46.9	16	12.5			52	40.6	76	59.4		
BAI>15	31	20	64.5	8	25.8	3	9.7	p = 0.027	67.0%	20	64.5	11	35.5	p = 0.008	77.3%
FHA+	68	34	50.0	27	39.7	7	10.3	p = 0.239		34	50.0%	34	50.0%	p = 0.106	95% CI (0.14 to 0.75)

rs356200	C/C		C/T		T/T		Khi2 ddl=2	Power	T-		T+		Khi2 ddl=1	Power	
	n	%	n	%	n	%			n	%	n	%			
Patients	128	35	27.3	62	48.4	31	24.2			35	27.3	93	72.7		
BAI>15	29	11	37.9	13	44.8	5	17.2	p = 0.487		11	37.9	18	62.1	p = 0.269	
FHA+	66	24	36.4	27	40.9	15	22.7	p = 0.103		24	36.4	42	63.6	p = 0.038	53.5%

rs2119787	A/A		A/G		G/G		Khi2 ddl=2	Power	G-		G+		Khi2 ddl=1	
	n	%	n	%	n	%			n	%	n	%		
Patients	128	62	48.4	53	41.4	13	10.2			61	47.7	66	51.6	
BAI>15	31	10	32.3	16	51.6	5	16.1	p = 0.249		10	32.3	21	67.7	p = 0.100
FHA+	66	30	45.5	26	39.4	10	15.2	p = 0.617		30	45.5	36	54.5	p = 0.409

Bold values indicate statistical significant differences.

quinine preference at the 0.1 mM concentration. It must be emphasized that the sensitivity to the aversive orosensory properties of quinine has been shown to be predictive of reduced acceptance of EtOH (Loney and Meyer, 2018). Thus, the lower preference for the bitter taste may partially explain the lower propensity to drink EtOH. It is unlikely that the strain difference in EtOH-related behaviors may be linked to difference in EtOH uptake since we did not observe strain difference in BEC after the 1.5 g/kg EtOH injection.

In the locomotor activity test, there was no strain difference in the activity levels, which is consistent with previous reports showing that the lack of α -synuclein does not induce deficits in motor performance (Abeliovich et al., 2000; Peña-Oliver et al., 2010; Senior et al., 2008).

Previous human and animal studies have suggested an association between α -synuclein and AUD, but very few studies have examined the lack of *Snca* expression in the context of drug addiction. Animal studies (Clarimon et al., 2007) have shown that α -synuclein expression is increased after chronic EtOH exposure in the blood or in brain amygdala (Walker and Grant, 2006; Ziolkowska et al., 2008). Other studies using inbred EtOH-preferring and nonpreferring rats have demonstrated a link between the *Snca* locus and EtOH addiction (Liang and Carr, 2006; Spence et al., 2009) and that there is an increase in α -synuclein expression (mRNA and protein levels) in the hippocampus of EtOH-preferring rats compared with nonpreferring rats (Liang et al., 2003). In patients displaying EtOH addiction, EtOH craving, and impulsivity, an increase in α -synuclein expression (mRNA and protein levels) in blood has been also demonstrated (Bönsch et al., 2004, 2005a).

Preclinical studies have demonstrated an increase in α -synuclein expression in EtOH-naïve EtOH-preferring rats

and after chronic EtOH intake in outbred animals. These studies suggest that an innate high level of α -synuclein expression may be a predisposing factor and that alcohol intake by itself induces an increase in α -synuclein expression. Taken together, these data suggest that a low level of α -synuclein expression or the lack of *Snca* expression could be associated with a low propensity to drink EtOH, as we observed.

α -Synuclein has been involved in addiction and especially in AUD and anxiodepressive syndromes. Since anxiety is known as a major relapse factor in AUD, discerning the links between α -synuclein-mediated effects of EtOH and anxiety is important. The results of the present investigation support the involvement of the α -synuclein gene in the anxiolytic effects of EtOH. Given the scope of the emotionality tests we used, and the even more convincing results obtained from the open field and the elevated plus maze, the results clearly demonstrate a lack of response of the *Snca* mutant mice to the anxiolytic effects of EtOH. With respect to the basal level of anxiety-like behavior, our results are mixed. In mice that were exposed or not to EtOH for several weeks using a 2-bottle choice paradigm and then tested in our anxiety test battery, we did not observe any significant effect of the *Snca* mutation (Figs 4 and 5). However, in this first set of experiments, mice were singly housed and the environmental conditions were anxiogenic since we used 200 lux during the anxiety tests. Thus, our results are in line with those of a previous study showing that the *Snca* gene is not involved in unconditioned anxiety (Peña-Oliver et al., 2010). In our other experiments, however, an increase in anxiety-like behavior was seen when mice were group-housed and tested in less anxiogenic conditions (100 lux) (Fig. 7). Such conditions were preferred here in the context of measuring anxiety during EtOH withdrawal to avoid a ceiling effect with the

hyperanxious state induced by EtOH withdrawal. Mutant mice exposed only to air (i.e., no EtOH) displayed a decrease in both the number of entries and the time spent in the light compartment, but no change in the latency. Altogether, our results suggest that mutant mice are more anxious in a low anxiogenic context. Interestingly, our data revealed that anxiety-like behavior induced after withdrawal from continuous exposure to EtOH vapor is largely increased in comparison with withdrawal induced after intermittent exposure. It is unlikely that this difference may be linked to difference in EtOH uptake or the duration of the EtOH exposure (Fig. 6).

Our results on EtOH withdrawal-induced convulsion clearly demonstrate that *Snc*a mutant mice display an increase in withdrawal severity. Studies on the role of α -synuclein in withdrawal from drugs of abuse are scarce, but states of withdrawal have been shown to up-regulate peripheral SNCA protein expression in animals (Ziolkowska et al., 2008) and human substance users (Bönsch et al., 2004, 2005a; Mash et al., 2008). The neurobiological mechanism by which α -synuclein may modulate the anxiolytic effect of EtOH and the EtOH withdrawal severity is unknown. Interestingly, α -synuclein interacts with different pathways and neurotransmitters that play a role both in anxiety and addiction. α -synuclein is involved in monoamine metabolism, such as that of serotonin and norepinephrine, both of which are involved in anxious and addictive disorders. Changes in transporters (MAT, DAT, SERT, and NET) could be induced by the lack of α -synuclein, and thus may impair the anxiolytic effect of EtOH and EtOH withdrawal severity.

Given our preclinical data demonstrating the involvement of the *Snc*a gene in the sensitivity to the anxiolytic effects of EtOH, our study investigated the genetic association between selected informative SNPs of the *SNCA* gene and anxiety levels in patients displaying AUD. All of the 3 SNPs present a sufficient level of heterozygosity, 2 are Tag-SNPs (rs2119787 and rs356219) and located nearby regulation regions, respectively, near the ATG codon and near the 3'UTR. Our results show an association between the rs356219 SNP and a moderate to high level of anxiety (BAI score > 15). Thus, the current findings highlight a new mechanism by which the *SNCA* gene may play a role in anxiety associated with AUD. In addition, we found a significant positive correlation between anxiety level and AUDIT scores. The present findings showing a positive correlation between AUDIT scores and levels of anxiety and associations between anxiety levels and *SNCA* SNPs are supported by preclinical data showing a possible role for α -synuclein in anxiety-like behaviors (George et al., 2008) and in AUD (Liang and Carr, 2006), but our data are the first to show the role of α -synuclein in EtOH-induced anxiolysis in animals and in anxiety of EtOH-dependent patients. We also found a significant association between the rs356200 SNP and a positive familial history of AUD, thus suggesting that alteration in anxiety levels associated with AUD may have a genetic component. Studies in both humans and animal models brought evidence regarding the genetic basis

of EtOH dependence and other psychological variables, such as anxiety. Genetic association studies have demonstrated a significant association between EtOH dependence and craving with a SNP of *SNCA* (Clarimon et al., 2007; Foroud et al., 2007). The promoter region of the *SNCA* gene (REP1) has also been shown to be associated with AUD (Bönsch et al., 2005a; Brighina et al., 2009).

Though we found a significant association between the rs356219 SNP and a higher level of anxiety in patients, we did not find strain differences in the level of EtOH withdrawal-induced anxiety-like behavior in mice. This may constitute a limitation in our translational approach when comparing SNP genetic variations in humans with the C57BL/6JOLA^{Hsd} mutant strain (Specht and Schoepfer, 2004). In addition, another limitation is that we used only male mice while our human sample includes both males and females. Thus, additional studies in humans are warranted.

Overall, the present study demonstrated a role of α -synuclein in EtOH intake, anxiolytic effects of EtOH, and severity of EtOH withdrawal in animals. We also found an association between the severity of anxiety symptoms and *SNCA* variants in EtOH-dependent patients. Future studies are needed in order to better characterize the neurobiological substrate underlying the cellular mechanisms explaining how α -synuclein is involved in the sensitivity to the anxiolytic properties of EtOH and can modulate withdrawal severity.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Conseil Régional de Picardie and the National Institute of Health and Medical Research (INSERM). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

WP, C-AP, HH, CG, AD, MM, and MN designed all experiments. WP, C-AP, JA, and HH conducted the experiments. WP, C-AP, HH, MM, and MN analyzed the data and wrote the paper.

CONFLICTS OF INTEREST

MN has received lecture or expert fees from Merck-Serono, Lundbeck, Indivior, and Bouchara-Recordati. AD has received lecture or expert fees from Indivior, Janssen, Lundbeck, and Otsuka. All other authors have no conflict of interests.

REFERENCES

- Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho W-H, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JMG, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A (2000) Mice lacking

- α -synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25:239–252.
- Alaux-Cantin S, Buttolo R, Houchi H, Jeanblanc J, Naassila M (2015) Memantine reduces alcohol drinking but not relapse in alcohol-dependent rats. *Addict Biol* 20:890–901.
- American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th edn. American Psychiatric Association, Washington, DC.
- Babor T, Higgins-Biddle JC, Saunders JB, Monteiro MG (2001) *The Alcohol Use Disorders Identification Test: Guidelines for Use in Primary Care*. pp 1–40. World Health Organization, Geneva.
- Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA (1988) An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. *J Consult Clin Psychol* 56:893–897.
- Bönsch D, Greifengberg V, Bayerlein K, Biermann T, Reulbach U, Hillemacher T, Kornhuber J, Bleich S (2005a) Alpha-synuclein protein levels are increased in alcoholic patients and are linked to craving. *Alcohol Clin Exp Res* 29:763–765.
- Bönsch D, Lederer T, Reulbach U, Hothorn T, Kornhuber J, Bleich S (2005b) Joint analysis of the NACP-REP1 marker within the alpha synuclein gene concludes association with alcohol dependence. *Hum Mol Genet* 14:967–971.
- Bönsch D, Reulbach U, Bayerlein K, Hillemacher T, Kornhuber J, Bleich S (2004) Elevated alpha synuclein mRNA levels are associated with craving in patients with alcoholism. *Biol Psychiatry* 56:984–986.
- Brighina L, Schneider NK, Lesnick TG, de Andrade M, Cunningham JM, Mrazek D, Rocca WA, Maraganore DM (2009) Alpha-synuclein, alcohol use disorders, and Parkinson disease: a case-control study. *Parkinsonism Relat Disord* 15:430–434.
- Carr LG, Kimpel MW, Liang T, McClintick JN, McCall K, Morse M, Edenberg HJ (2007) Identification of candidate genes for alcohol preference by expression profiling of congenic rat strains. *Alcohol Clin Exp Res* 31:1089–1098.
- Caudal D, Alvarsson A, Bjorklund A, Svenningsson P (2015) Depressive-like phenotype induced by AAV-mediated overexpression of human alpha-synuclein in midbrain dopaminergic neurons. *Exp Neurol* 273:243–252.
- Chen K, Song F, Calin GA, Wei Q, Hao X, Zhang W (2008) Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. *Carcinogenesis* 29:1306–1311.
- Chiavegatto S, Izidio GS, Mendes-Lana A, Aneas I, Freitas Ta, Torráo aS, Conceição IM, Britto LRG, Ramos A (2009) Expression of alpha-synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. *Mol Psychiatry* 14:894–905.
- Clarimon J, Gray RR, Williams LN, Enoch MA, Robin RW, Albaugh B, Singleton A, Goldman D, Mulligan CJ (2007) Linkage disequilibrium and association analysis of alpha-synuclein and alcohol and drug dependence in two American Indian populations. *Alcohol Clin Exp Res* 31:546–554.
- Foroud T, Wetherill LF, Liang T, Dick DM, Hesselbrock V, Kramer J, Nurnberger J, Schuckit M, Carr L, Porjesz B, Xuei X, Edenberg HJ (2007) Association of alcohol craving with alpha-synuclein (SNCA). *Alcohol Clin Exp Res* 31:537–545.
- George S, van den Buuse M, San Mok S, Masters CL, Li QX, Culvenor JG (2008) α -Synuclein transgenic mice exhibit reduced anxiety-like behaviour. *Exp Neurol* 210:788–792.
- Georges M, Coppieters W, Charlier C (2007) Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. *Curr Opin Genet Dev* 17:166–176.
- Janecek P, Brooker C, Dodd PR, Lewohl JM (2015) Differential expression of α -synuclein splice variants in the brain of alcohol misusers: influence of genotype. *Drug Alcohol Depend* 155:284–292.
- Janecek P, Lewohl JM (2013) The role of α -synuclein in the pathophysiology of alcoholism. *Neurochem Int* 63:154–162.
- Janecek P, MacKay RK, Lea RA, Dodd PR, Lewohl JM (2014) Reduced expression of α -synuclein in alcoholic brain: influence of SNCA-Rep1 genotype. *Addict Biol* 19:509–515.
- Legastelois R, Botia B, Coune F, Jeanblanc J, Naassila M (2014) Deciphering the relationship between vulnerability to ethanol-induced behavioral sensitization and ethanol consumption in outbred mice. *Addict Biol* 19:210–224.
- Levey DF, Le-Niculescu H, Frank J, Ayalew M, Jain N, Kiriln B, Learman R, Winiger E, Rodd Z, Shekhar A, Schork N, Kiefer F, Kiefe F, Wodarz N, Müller-Myhsok B, Dahmen N, Nöthen M, Sherva R, Farrer L, Smith AH, Kranzler HR, Rietschel M, Gelernter J, Niculescu AB (2014) Genetic risk prediction and neurobiological understanding of alcoholism. *Transl Psychiat* 4:e391.
- Liang T, Carr LG (2006) Regulation of alpha-synuclein expression in alcohol-preferring and -non preferring rats. *J Neurochem* 99:470–482.
- Liang T, Kimpel MW, McClintick JN, Skillman AR, McCall K, Edenberg HJ, Carr LG (2010) Candidate genes for alcohol preference identified by expression profiling in alcohol-preferring and -nonpreferring reciprocal congenic rats. *Genome Biol* 11:R11.
- Liang T, Spence J, Liu L, Strother WN, Chang HW, Ja Ellison, Lumeng L, Li T-K, Foroud T, Carr LG (2003) alpha-Synuclein maps to a quantitative trait locus for alcohol preference and is differentially expressed in alcohol-preferring and -nonpreferring rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4690–4695.
- Loney GC, Meyer PJ (2018) Brief exposures to the taste of ethanol (EtOH) and quinine promote subsequent acceptance of EtOH in a paradigm that minimizes postingestive consequences. *Alcohol Clin Exp Res* 42:589–602.
- Lopez-Jimenez A, Walter NA, Gine E, Santos A, Echeverry-Alzate V, Buhler KM, Olmos P, Giezendanner S, Moratalla R, Montoliu L, Buck KJ, Lopez-Moreno JA (2013) A spontaneous deletion of alpha-synuclein is associated with an increase in CB1 mRNA transcript and receptor expression in the hippocampus and amygdala: effects on alcohol consumption. *Synapse* 67:280–289.
- Mash DC, Adi N, Duque L, Pablo J, Kumar M, Ervin FR (2008) Alpha synuclein protein levels are increased in serum from recently abstinent cocaine abusers. *Drug Alcohol Depend* 94:246–250.
- Morris EP, Stewart SH, Ham LS (2005) The relationship between social anxiety disorder and alcohol use disorders: a critical review. *Clin Psychol Rev* 25:734–760.
- Oksman M, Tanila H, Yavich L (2006) Brain reward in the absence of alpha-synuclein. *NeuroReport* 17:1191–1194.
- Peña-Oliver Y, Buchman VL, Stephens DN (2010) Lack of involvement of alpha-synuclein in unconditioned anxiety in mice. *Behav Brain Res* 209:234–240.
- Peña-Oliver Y, Sanchez-Roige S, Stephens DN, Ripley TN (2014) Alpha-synuclein deletion decreases motor impulsivity but does not affect risky decision making in a mouse Gambling Task. *Psychopharmacology* 231:2493–2506.
- Rice JP, Reich T, Bucholz KK, Neuman RJ, Fishman R, Rochberg N, Hesselbrock VM, Nurnberger JI, Schuckit MA, Begleiter H (1995) Comparison of direct interview and family history diagnoses of alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 19:1018–1023.
- Richard IH (2005) Anxiety disorders in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 96:42–55.
- Rotermund C, Reolon GK, Leixner S, Boden C, Bilbao A, Kahle PJ (2017) Enhanced motivation to alcohol in transgenic mice expressing human α -synuclein. *J Neurochem* 143:294–305.
- Saunders JB, Aasland OG, Babor TF, De La Fumete JR, Grant M (1993) Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO collaborative project on early detection of persons with harmful alcohol consumption II. *Addiction* 88:791–804.
- Senior SL, Ninkina N, Deacon R, Bannerman D, Buchman VL, Cragg SJ, Wade-Martins R (2008) Increased striatal dopamine release and hyperdopaminergic-like behaviour in mice lacking both alpha-synuclein and gamma-synuclein. *Eur J Neurosci* 27:947–957.
- Siegmund A, Langnaese K, Wotjak CT (2005) Differences in extinction of conditioned fear in C57BL/6 substrains are unrelated to expression of α -synuclein. *Behav Brain Res* 157:291–298.

- Simon O'Brien E, Legastelois R, Houchi H, Vilpoux C, Alaux-Cantin S, Pierrefiche O, André E, Naassila M (2011) Fluoxetine, desipramine, and the dual antidepressant milnacipran reduce alcohol self-administration and/or relapse in dependent rats. *Neuropsychopharmacology* 36:1518–1530.
- Specht CG, Schoepfer R (2004) Deletion of multimerin-1 in alpha-synuclein-deficient mice. *Genomics* 83:1176–1178.
- Spence JP, Liang T, Liu L, Johnson PL, Foroud T, Carr LG, Shekhar A (2009) From QTL to candidate gene: a genetic approach to alcoholism research. *Curr Drug Abuse Rev* 2:127–134.
- Walker SJ, Grant KA (2006) Peripheral blood alpha-synuclein mRNA levels are elevated in cynomolgus monkeys that chronically self-administer ethanol. *Alcohol* 38:1–4.
- Wersinger C, Sidhu A (2003) Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. *Neurosci Lett* 340:189–192.
- Ziolkowska B, Gieryk A, Wawrzczak-Bargiela A, Krowka T, Kaminska D, Korkosz A, Bienkowski P, Przewlocki R (2008) α -Synuclein expression in the brain and blood during abstinence from chronic alcohol drinking in mice. *Neuropharmacology* 54:1239–1246.

Bibliographie

Abou-Alfa, G.K., Meyer, T., Cheng, A.-L., El-Khoueiry, A.B., Rimassa, L., Ryoo, B.-Y., Cicin, I., Merle, P., Chen, Y., Park, J.-W., et al. (2018). Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 379, 54–63.

Agopian, V.G., Harlander-Locke, M.P., Markovic, D., Zarrinpar, A., Kaldas, F.M., Cheng, E.Y., Yersiz, H., Farmer, D.G., Hiatt, J.R., and Busuttil, R.W. (2017). Evaluation of Patients With Hepatocellular Carcinomas That Do Not Produce α -Fetoprotein. *JAMA Surg* 152, 55–64.

Ahluwalia, J.K., Khan, S.Z., Soni, K., Rawat, P., Gupta, A., Hariharan, M., Scaria, V., Lalwani, M., Pillai, B., Mitra, D., et al. (2008). Human cellular microRNA hsa-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication. *Retrovirology* 5, 117.

Ali, H.E.A., Abdel Hameed, R., Effat, H., Ahmed, E.K., Atef, A.A., Sharawi, S.K., Ali, M., Abd Elmageed, Z.Y., and Abdel Wahab, A.H. (2017). Circulating microRNAs panel as a diagnostic tool for discrimination of HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 41, e51–e62.

Ambade, A., Satishchandran, A., Gyongyosi, B., Lowe, P., and Szabo, G. (2016). Adult mouse model of early hepatocellular carcinoma promoted by alcoholic liver disease. *World J. Gastroenterol.* 22, 4091–4108.

Amr, K.S., Ezzat, W.M., Elhosary, Y.A., Hegazy, A.E., Fahim, H.H., and Kamel, R.R. (2016). The potential role of miRNAs 21 and 199-a in early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Gene* 575, 66–70.

Ansonge, M., and Pompe, T. (2018). Systems for localized release to mimic paracrine cell communication in vitro. *J Control Release* 278, 24–36.

Araújo, R.F., Lira, G.A., Guedes, H.G., Cardoso, M.A., Cavalcante, F.J., Araújo, A.L.M., Ramos, C.C.O., and de Araújo, A.A. (2013). Lifestyle and family history influence cancer prognosis in Brazilian individuals. *Pathol. Res. Pract.* 209, 753–757.

Aroor, A.R., Jackson, D.E., and Shukla, S.D. (2011). Elevated activation of ERK1 and ERK2 accompany enhanced liver injury following alcohol binge in chronically ethanol-fed rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 35, 2128–2138.

Ashmawy, A.M., Elgeshy, K.M., Abdel Salam, E.-S.T., Ghareeb, M., Kobaisi, M.H., Amin, H.A.A., Sharawy, S.K., and Abdel Wahab, A.H.A. (2017). Crosstalk between liver-related microRNAs and Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma patients. *Arab J Gastroenterol* 18, 144–150.

Backes, C., Meese, E., and Keller, A. (2016). Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Mol Diagn Ther* 20, 509–518.

Bala, S., and Szabo, G. (2012). MicroRNA Signature in Alcoholic Liver Disease. *Int J Hepatol* 2012, 498232.

Bala, S., Petrasek, J., Mundkur, S., Catalano, D., Levin, I., Ward, J., Alao, H., Kodys, K., and Szabo, G. (2012). Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and

inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology* 56, 1946–1957.

Bala, S., Csak, T., Saha, B., Zatsiorsky, J., Kodys, K., Catalano, D., Satishchandran, A., and Szabo, G. (2016). The pro-inflammatory effects of miR-155 promote liver fibrosis and alcohol-induced steatohepatitis. *J. Hepatol.* 64, 1378–1387.

Bandiera, S., Pfeffer, S., Baumert, T.F., and Zeisel, M.B. (2015). miR-122--a key factor and therapeutic target in liver disease. *J. Hepatol.* 62, 448–457.

Bandyopadhyay, S., Friedman, R.C., Marquez, R.T., Keck, K., Kong, B., Icardi, M.S., Brown, K.E., Burge, C.B., Schmidt, W.N., Wang, Y., et al. (2011). Hepatitis C virus infection and hepatic stellate cell activation downregulate miR-29: miR-29 overexpression reduces hepatitis C viral abundance in culture. *J. Infect. Dis.* 203, 1753–1762.

Barletta, E., Tinessa, V., and Daniele, B. (2005). [Screening of hepatocellular carcinoma: role of the alpha-fetoprotein (AFP) and ultrasonography]. *Recenti Prog Med* 96, 295–299; quiz 328.

Baxter, M., Withey, S., Harrison, S., Segeritz, C.-P., Zhang, F., Atkinson-Dell, R., Rowe, C., Gerrard, D.T., Sison-Young, R., Jenkins, R., et al. (2015). Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J. Hepatol.* 62, 581–589.

Becker, P.P., Rau, M., Schmitt, J., Malsch, C., Hammer, C., Bantel, H., Müllhaupt, B., and Geier, A. (2015). Performance of Serum microRNAs -122, -192 and -21 as Biomarkers in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS ONE* 10, e0142661.

Belghiti, J., Hiramatsu, K., Benoist, S., Massault, P., Sauvanet, A., and Farges, O. (2000). Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J. Am. Coll. Surg.* 191, 38–46.

Bell, C.C., Hendriks, D.F.G., Moro, S.M.L., Ellis, E., Walsh, J., Renblom, A., Fredriksson Puigvert, L., Dankers, A.C.A., Jacobs, F., Snoeys, J., et al. (2016). Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Sci Rep* 6, 25187.

Bell, H., Jahnsen, J., Kittang, E., Raknerud, N., and Sandvik, L. (2004). Long-term prognosis of patients with alcoholic liver cirrhosis: a 15-year follow-up study of 100 Norwegian patients admitted to one unit. *Scand. J. Gastroenterol.* 39, 858–863.

Belloni, L., Cocco, S.D., Guerrieri, F., Nunn, A.D.G., Piconese, S., Salerno, D., Testoni, B., Pulito, C., Mori, F., Pallocca, M., et al. (2018). Targeting a phospho-STAT3-miRNAs pathway improves vesicular hepatic steatosis in an in vitro and in vivo model. *Scientific Reports* 8, 13638.

Bertola, A., Mathews, S., Ki, S.H., Wang, H., and Gao, B. (2013). Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc* 8, 627–637.

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

- Bharali, D., Banerjee, B.D., Bharadwaj, M., Husain, S.A., and Kar, P. (2019). Expression Analysis of MicroRNA-21 and MicroRNA-122 in Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Exp Hepatol* 9, 294–301.
- Bhattacharya, S., Steele, R., Shrivastava, S., Chakraborty, S., Di Bisceglie, A.M., and Ray, R.B. (2016). Serum miR-30e and miR-223 as Novel Noninvasive Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Am. J. Pathol.* 186, 242–247.
- Bhogal, R.H., Hodson, J., Bartlett, D.C., Weston, C.J., Curbishley, S.M., Haughton, E., Williams, K.T., Reynolds, G.M., Newsome, P.N., Adams, D.H., et al. (2011). Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience. *PLoS ONE* 6, e18222.
- Bialecki, E.S., and Di Bisceglie, A.M. (2005). Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)* 7, 26–34.
- Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D., and RoudotèThoraval, F. (2013). The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol* 58, 593–608.
- Blanc, J.-F., Boige, V., Bouattour, M., Dauvois, B., Decaens, T., Farges, O., Hollebecque, A., Merle, P., Roth, G., Ruiz, I., et al. (2017). Carcinome Hépatocellulaire. In *Thésaurus National de Cancérologie Digestive*, p. 36.
- Bofill-De Ros, X., Yang, A., and Gu, S. (2019). IsomiRs: Expanding the miRNA repression toolbox beyond the seed. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.*
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185–191.
- Bolognesi, M., Verardo, A., and Di Pascoli, M. (2014). Peculiar characteristics of portal-hepatic hemodynamics of alcoholic cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* 20, 8005–8010.
- Bonaldi, C., and Hill, C. (2019). Alcohol-attributable mortality in France in 2015. *Bull Epidémiol Hebd* 5, 97–108.
- Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1097–1101.
- Bosque-Prous, M., Mendieta-Paredes, J., Bartroli, M., Brugal, M.T., and Espelt, A. (2018). Cancer and Alcohol Consumption in People Aged 50 Years or More in Europe. *Alcohol Alcohol.* 53, 317–324.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424.
- Broughton, J.P., Lovci, M.T., Huang, J.L., Yeo, G.W., and Pasquinelli, A.E. (2016). Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol. Cell* 64, 320–333.

Bruix, J., Sherman, M., and Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases (2005). Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 42, 1208–1236.

Bruix, J., Qin, S., Merle, P., Granito, A., Huang, Y.-H., Bodoky, G., Pracht, M., Yokosuka, O., Rosmorduc, O., Breder, V., et al. (2017). Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 389, 56–66.

Buchmann, A., Bauer-Hofmann, R., Mahr, J., Drinkwater, N.R., Luz, A., and Schwarz, M. (1991). Mutational activation of the c-Ha-ras gene in liver tumors of different rodent strains: correlation with susceptibility to hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 911–915.

Calo, N., Ramadori, P., Sobolewski, C., Romero, Y., Maeder, C., Fournier, M., Rantakari, P., Zhang, F.-P., Poutanen, M., Dufour, J.-F., et al. (2016). Stress-activated miR-21/miR-21* in hepatocytes promotes lipid and glucose metabolic disorders associated with high-fat diet consumption. *Gut* 65, 1871–1881.

Castaneda, F., and Kinne, R. (2004). Ethanol treatment of hepatocellular carcinoma: high potentials of low concentrations. *Cancer Biol Ther* 3, 430–433.

Chang, T.-C., Wentzel, E.A., Kent, O.A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K.H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C.J., et al. (2007). Transactivation of miR-34a by p53 Broadly Influences Gene Expression and Promotes Apoptosis. *Molecular Cell* 26, 745–752.

Charras, G., and Sahai, E. (2014). Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 813–824.

Chaudhry, K.K., Samak, G., Shukla, P.K., Mir, H., Gangwar, R., Manda, B., Isse, T., Kawamoto, T., Salaspuro, M., Kaihovaara, P., et al. (2015). ALDH2 Deficiency Promotes Ethanol-Induced Gut Barrier Dysfunction and Fatty Liver in Mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 39, 1465–1475.

Chi, S.W., Zang, J.B., Mele, A., and Darnell, R.B. (2009). Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* 460, 479–486.

Cho, H.J., Kim, S.S., Nam, J.S., Kim, J.K., Lee, J.H., Kim, B., Wang, H.J., Kim, B.W., Lee, J.-D., Kang, D.Y., et al. (2017). Low levels of circulating microRNA-26a/29a as poor prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma who underwent curative treatment. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 41, 181–189.

Cho, Y.K., Kim, J.K., Kim, M.Y., Rhim, H., and Han, J.K. (2009). Systematic review of randomized trials for hepatocellular carcinoma treated with percutaneous ablation therapies. *Hepatology* 49, 453–459.

CIRC, C.I. de R. sur le C. (1988). ARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans : alcohol drinking. (Lyon), p. 425.

CIRC, C.I. de R. sur le C. (2014). World Cancer Report (Lyon: CIRC).

Colli, A., Fraquelli, M., Casazza, G., Massironi, S., Colucci, A., Conte, D., and Duca, P. (2006). Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Am. J. Gastroenterol.* *101*, 513–523.

Compagnon, P., Grandadam, S., Lorho, R., Turlin, B., Camus, C., Jianrong, Y., Lainé, F., Meunier, B., Deugnier, Y., and Boudjema, K. (2008). Liver transplantation for hepatocellular carcinoma without preoperative tumor biopsy. *Transplantation* *86*, 1068–1076.

Cook, R.T., Schlueter, A.J., Coleman, R.A., Tygrett, L., Ballas, Z.K., Jerrells, T.R., Nashelsky, M.B., Ray, N.B., Haugen, T.H., and Waldschmidt, T.J. (2007). Thymocytes, pre-B cells, and organ changes in a mouse model of chronic ethanol ingestion--absence of subset-specific glucocorticoid-induced immune cell loss. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *31*, 1746–1758.

Córdova-Rivas, S., Fraire-Soto, I., Mercado-Casas Torres, A., Servín-González, L.S., Granados-López, A.J., López-Hernández, Y., Reyes-Estrada, C.A., Gutiérrez-Hernández, R., Castañeda-Delgado, J.E., Ramírez-Hernández, L., et al. (2019). 5p and 3p Strands of miR-34 Family Members Have Differential Effects in Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Cervical Cancer Cells. *Int J Mol Sci* *20*.

D'Amico, G., Morabito, A., Pagliaro, L., and Marubini, E. (1986). Survival and prognostic indicators in compensated and decompensated cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.* *31*, 468–475.

D'Amico, G., Garcia-Tsao, G., and Pagliaro, L. (2006). Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J. Hepatol.* *44*, 217–231.

Dang, Y., Luo, D., Rong, M., and Chen, G. (2013). Underexpression of miR-34a in Hepatocellular Carcinoma and Its Contribution towards Enhancement of Proliferating Inhibitory Effects of Agents Targeting c-MET. *PLOS ONE* *8*, e61054.

Day, G.L., Blot, W.J., Shore, R.E., McLaughlin, J.K., Austin, D.F., Greenberg, R.S., Liff, J.M., Preston-Martin, S., Sarkar, S., and Schoenberg, J.B. (1994). Second cancers following oral and pharyngeal cancers: role of tobacco and alcohol. *J. Natl. Cancer Inst.* *86*, 131–137.

Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* *432*, 231–235.

Denucci, S.M., Tong, M., Longato, L., Lawton, M., Setshedi, M., Carlson, R.I., Wands, J.R., and de la Monte, S.M. (2010). Rat strain differences in susceptibility to alcohol-induced chronic liver injury and hepatic insulin resistance. *Gastroenterol Res Pract* *2010*.

Desdín-Micó, G., and Mittelbrunn, M. (2017). Role of exosomes in the protection of cellular homeostasis. *Cell Adh Migr* *11*, 127–134.

Dhanda, A.D., Lee, R.W., Collins, P.L., and McCune, C.A. (2012). Molecular targets in the treatment of alcoholic hepatitis. *World J. Gastroenterol.* *18*, 5504–5513.

- Dippold, R.P., Vadigepalli, R., Gonye, G.E., Patra, B., and Hoek, J.B. (2013). Chronic Ethanol Feeding Alters miRNA Expression Dynamics During Liver Regeneration. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 37, E59–E69.
- Doffoël, M., Bonnetain, F., Bouché, O., Vetter, D., Abergel, A., Fratté, S., Grangé, J.D., Stremisdoerfer, N., Blanchi, A., Bronowicki, J.P., et al. (2008). Multicentre randomised phase III trial comparing Tamoxifen alone or with Transarterial Lipiodol Chemoembolisation for unresectable hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients (Fédération Francophone de Cancérologie Digestive 9402). *Eur. J. Cancer* 44, 528–538.
- Dong, J., Zhai, B., Sun, W., Hu, F., Cheng, H., and Xu, J. (2017a). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/snail signaling pathway contributes to epithelial-mesenchymal transition-induced multi-drug resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS ONE* 12, e0185088.
- Dong, Y.W., Wang, R., Cai, Q.Q., Qi, B., Wu, W., Zhang, Y.H., and Wu, X.Z. (2014). Sulfatide epigenetically regulates miR-223 and promotes the migration of human hepatocellular carcinoma cells. *J. Hepatol.* 60, 792–801.
- Dong, Z., Qi, R., Guo, X., Zhao, X., Li, Y., Zeng, Z., Bai, W., Chang, X., Hao, L., Chen, Y., et al. (2017b). MiR-223 modulates hepatocellular carcinoma cell proliferation through promoting apoptosis via the Rab1-mediated mTOR activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483, 630–637.
- Dou, C., Wang, Y., Li, C., Liu, Z., Jia, Y., Li, Q., Yang, W., Yao, Y., Liu, Q., and Tu, K. (2015). MicroRNA-212 suppresses tumor growth of human hepatocellular carcinoma by targeting FOXA1. *Oncotarget* 6, 13216–13228.
- Druesne-Pecollo, N., Keita, Y., Touvier, M., Chan, D.S.M., Norat, T., Hercberg, S., and Latino-Martel, P. (2014). Alcohol drinking and second primary cancer risk in patients with upper aerodigestive tract cancers: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23, 324–331.
- Dubinkina, V.B., Tyakht, A.V., Odintsova, V.Y., Yarygin, K.S., Kovarsky, B.A., Pavlenko, A.V., Ischenko, D.S., Popenko, A.S., Alexeev, D.G., Taraskina, A.Y., et al. (2017). Links of gut microbiota composition with alcohol dependence syndrome and alcoholic liver disease. *Microbiome* 5, 141.
- EASL (2018). Hepahealth Project Report : Risk factors and the burden of liver disease in Europe and selected central Asian countries. (Paris: EASL).
- Eguchi, A., Lazaro, R., Wang, J., Kim, J., Povero, D., Williams, B., Ho, S.B., Stärkel, P., Schanabi, B., Ohno-Machado, L., et al. (2017). Extracellular vesicles released by hepatocytes from gastric infusion model of alcoholic liver disease contain a MicroRNA barcode that can be detected in blood. *Hepatology* 65, 475–490.
- El Tayebi, H.M., Waly, A.A., Assal, R.A., Hosny, K.A., Esmat, G., and Abdelaziz, A.I. (2015). Transcriptional activation of the IGF-II/IGF-1R axis and inhibition of IGFBP-3 by miR-155 in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 10, 3206–3212.

Elamin, E.E., Masclee, A.A., Dekker, J., and Jonkers, D.M. (2013). Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. *Nutr. Rev.* *71*, 483–499.

El-Khoueiry, A.B., Sangro, B., Yau, T., Crocenzi, T.S., Kudo, M., Hsu, C., Kim, T.-Y., Choo, S.-P., Trojan, J., Welling, T.H., et al. (2017). Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet* *389*, 2492–2502.

Esau, C., Davis, S., Murray, S.F., Yu, X.X., Pandey, S.K., Pear, M., Watts, L., Booten, S.L., Graham, M., McKay, R., et al. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* *3*, 87–98.

Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2009). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* *15*, 21–32.

Ezzat, W.M., Amr, K.S., Raouf, H.A., Elhosary, Y.A., Hegazy, A.E., Fahim, H.H., and Kamel, R.R. (2016). Relationship Between Serum microRNA155 and Telomerase Expression in Hepatocellular Carcinoma. *Arch. Med. Res.* *47*, 349–355.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* *136*, E359–386.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., Gavin, A., Visser, O., and Bray, F. (2018). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur. J. Cancer* *103*, 356–387.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* *9*, 102–114.

Fisher, R.L., and Vickers, A.E.M. (2013). Preparation and culture of precision-cut organ slices from human and animal. *Xenobiotica* *43*, 8–14.

Forner, A., Vilana, R., Ayuso, C., Bianchi, L., Solé, M., Ayuso, J.R., Boix, L., Sala, M., Varela, M., Llovet, J.M., et al. (2008). Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *47*, 97–104.

Forner, A., Reig, M., and Bruix, J. (2018). Hepatocellular carcinoma. *Lancet* *391*, 1301–1314.

Fu, X., Wen, H., Jing, L., Yang, Y., Wang, W., Liang, X., Nan, K., Yao, Y., and Tian, T. (2017). MicroRNA-155-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by suppressing PTEN through the PI3K/Akt pathway. *Cancer Sci.* *108*, 620–631.

Galli, A., Pinaire, J., Fischer, M., Dorris, R., and Crabb, D.W. (2001). The Transcriptional and DNA Binding Activity of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Is Inhibited by Ethanol Metabolism A NOVEL MECHANISM FOR THE DEVELOPMENT OF ETHANOL-INDUCED FATTY LIVER. *J. Biol. Chem.* *276*, 68–75.

Ganne-Carrié, N., Chaffaut, C., Bourcier, V., Archambeaud, I., Perarnau, J.-M., Oberti, F., Roulot, D., Moreno, C., Louvet, A., Dao, T., et al. (2018). Estimate of hepatocellular carcinoma's incidence in patients with alcoholic cirrhosis. *Journal of Hepatology*.

Gantier, M.P., McCoy, C.E., Rusinova, I., Saulep, D., Wang, D., Xu, D., Irving, A.T., Behlke, M.A., Hertzog, P.J., Mackay, F., et al. (2011). Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res.* *39*, 5692–5703.

Gao, B., and Bataller, R. (2011). Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutic Targets. *Gastroenterology* *141*, 1572–1585.

Ghosh Dastidar, S., Warner, J.B., Warner, D.R., McClain, C.J., and Kirpich, I.A. (2018). Rodent Models of Alcoholic Liver Disease: Role of Binge Ethanol Administration. *Biomolecules* *8*.

Giannelli, G., Koudelkova, P., Dituri, F., and Mikulits, W. (2016). Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* *65*, 798–808.

Gilpin, N.W., Richardson, H.N., Cole, M., and Koob, G.F. (2008). Vapor inhalation of alcohol in rats. *Curr Protoc Neurosci Chapter 9*, Unit 9.29.

Godoy, P., Schmidt-Heck, W., Natarajan, K., Lucendo-Villarin, B., Szkolnicka, D., Asplund, A., Björquist, P., Widera, A., Stöber, R., Campos, G., et al. (2015). Gene networks and transcription factor motifs defining the differentiation of stem cells into hepatocyte-like cells. *J. Hepatol.* *63*, 934–942.

Goldstein, A., and Judson, B.A. (1971). Alcohol dependence and opiate dependence: lack of relationship in mice. *Science* *172*, 290–292.

Gong, C., Fang, J., Li, G., Liu, H.-H., and Liu, Z.-S. (2017). Effects of microRNA-126 on cell proliferation, apoptosis and tumor angiogenesis via the down-regulating ERK signaling pathway by targeting EGFL7 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* *8*, 52527–52542.

Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* *432*, 235–240.

Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., and Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* *34*, D140–144.

Guennewig, B., Roos, M., Dogar, A.M., Gebert, L.F.R., Zagalak, J.A., Vongrad, V., Metzner, K.J., and Hall, J. (2014). Synthetic pre-microRNAs reveal dual-strand activity of miR-34a on TNF- α . *RNA* *20*, 61–75.

Guérin, S., Laplanche, A., Dunant, A., and Hill, C. (2013). Alcohol-attributable mortality in France. *Eur J Public Health* *23*, 588–593.

Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I.B., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Letexier, M., Degos, F., et al. (2012). Integrated analysis of somatic mutations

and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics* 44, 694–698.

Gulei, D., Raduly, L., Broseghini, E., Ferracin, M., and Berindan-Neagoe, I. (2019). The extensive role of miR-155 in malignant and non-malignant diseases. *Mol. Aspects Med.*

Günther, C., Brevini, T., Sampaziotis, F., and Neurath, M.F. (2019). What gastroenterologists and hepatologists should know about organoids in 2019. *Dig Liver Dis* 51, 753–760.

Guo, F., Zheng, K., Benedé-Ubieto, R., Cubero, F.J., and Nevzorova, Y.A. (2018). The Lieber-DeCarli Diet-A Flagship Model for Experimental Alcoholic Liver Disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 42, 1828–1840.

Guo, X., Guo, S., Pan, L., Ruan, L., Gu, Y., and Lai, J. (2017). Anti-microRNA-21/221 and microRNA-199a transfected by ultrasound microbubbles induces the apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *Oncol Lett* 13, 3669–3675.

Gyöngyösi, B., Végh, É., Járay, B., Székely, E., Fassan, M., Bodoky, G., Schaff, Z., and Kiss, A. (2014). Pretreatment MicroRNA Level and Outcome in Sorafenib-treated Hepatocellular Carcinoma. *J. Histochem. Cytochem.* 62, 547–555.

Hafner, M., Lianoglou, S., Tuschl, T., and Betel, D. (2012). Genome-wide identification of miRNA targets by PAR-CLIP. *Methods* 58, 94–105.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., and Kim, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887–901.

Han, Z.-B., Zhong, L., Teng, M.-J., Fan, J.-W., Tang, H.-M., Wu, J.-Y., Chen, H.-Y., Wang, Z.-W., Qiu, G.-Q., and Peng, Z.-H. (2012). Identification of recurrence-related microRNAs in hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Mol Oncol* 6, 445–457.

Haneklaus, M., Gerlic, M., O'Neill, L. a. J., and Masters, S.L. (2013). miR-223: infection, inflammation and cancer. *J. Intern. Med.* 274, 215–226.

Hanson, E.K., Lubenow, H., and Ballantyne, J. (2009). Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Analytical Biochemistry* 387, 303–314.

Hariharan, M., Scaria, V., Pillai, B., and Brahmachari, S.K. (2005). Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337, 1214–1218.

He, B., He, Y., Shi, W., Gong, S., Chen, X., Xiao, J., Gu, J., Ding, W., and Wang, Y. (2017). Bioinformatics analysis of gene expression alterations in microRNA-122 knockout mice with hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* 15, 3681–3689.

He, H., Huang, Y., Yang, D., Liang, B., Lin, L., Li, J.-L., Liao, H., and Guo, B. (2014). [Expression of miR-126/miR-126* in hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical outcomes]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 34, 1493–1497.

Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., and Tollervey, D. (2013). Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* *153*, 654–665.

Higuchi, H., Adachi, M., Miura, S., Gores, G.J., and Ishii, H. (2001). The mitochondrial permeability transition contributes to acute ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* *34*, 320–328.

Holmes, R.S., Duley, J.A., Algar, E.M., Mather, P.B., and Rout, U.K. (1986). Biochemical and genetic studies on enzymes of alcohol metabolism: the mouse as a model organism for human studies. *Alcohol Alcohol.* *21*, 41–56.

Hou, Z., and Quan, J. (2017). Hepatitis B virus X protein increases microRNA-21 expression and accelerates the development of hepatoma via the phosphatase and tensin homolog/phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway. *Mol Med Rep* *15*, 3285–3291.

Hu, M.-H., Ma, C.-Y., Wang, X.-M., Ye, C.-D., Zhang, G.-X., Chen, L., and Wang, J.-G. (2016). MicroRNA-126 inhibits tumor proliferation and angiogenesis of hepatocellular carcinoma by down-regulating EGFL7 expression. *Oncotarget* *7*, 66922–66934.

Huang, Q., Luo, K., Yang, H., Wen, J., Zhang, S., Li, J., Ela Bella, A., Liu, Q., Yang, F., Zheng, Y., et al. (2014). Impact of alcohol consumption on survival in patients with esophageal carcinoma: a large cohort with long-term follow-up. *Cancer Sci.* *105*, 1638–1646.

Huang, Y.-H., Yang, Y.-L., and Wang, F.-S. (2018). The Role of miR-29a in the Regulation, Function, and Signaling of Liver Fibrosis. *Int J Mol Sci* *19*.

Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I.K., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 16961–16966.

IHME, I. for H.M. and E. (2018). Global Burden of Disease project, Global Health Data Exchange.

Ishizawa, T., Hasegawa, K., Aoki, T., Takahashi, M., Inoue, Y., Sano, K., Imamura, H., Sugawara, Y., Kokudo, N., and Makuuchi, M. (2008). Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* *134*, 1908–1916.

Jampoka, K., Muangpaisarn, P., Khongnomnan, K., Treeprasertsuk, S., Tangkijvanich, P., and Payungporn, S. (2018). Serum miR-29a and miR-122 as Potential Biomarkers for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Microna* *7*, 215–222.

Ji, J., Xu, M., Tu, J., Zhao, Z., Gao, J., Chen, M., Song, J., Zhu, H., Cheng, X., Hui, J., et al. (2016). MiR-155 and its functional variant rs767649 contribute to the susceptibility and survival of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* *7*, 303–309.

Jia, P., Wei, G., Zhou, C., Gao, Q., Wu, Y., Sun, X., and Li, X. (2018). Upregulation of MiR-212 Inhibits Migration and Tumorigenicity and Inactivates Wnt/ β -Catenin Signaling in Human Hepatocellular Carcinoma. *Technol. Cancer Res. Treat.* *17*, 1533034618765221.

- Jiang, P., Liu, R., Zheng, Y., Liu, X., Chang, L., Xiong, S., and Chu, Y. (2012). MiR-34a inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through targeting Notch1 in murine macrophages. *Exp. Cell Res.* *318*, 1175–1184.
- Jing, B.-Q., Ou, Y., Zhao, L., Xie, Q., and Zhang, Y.-X. (2017). Experimental study on the prevention of liver cancer angiogenesis via miR-126. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* *21*, 5096–5100.
- Johnnidis, J.B., Harris, M.H., Wheeler, R.T., Stehling-Sun, S., Lam, M.H., Kirak, O., Brummelkamp, T.R., Fleming, M.D., and Camargo, F.D. (2008). Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* *451*, 1125–1129.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* *119*, 1420–1428.
- Kamath, P.S., Kim, W.R., and Advanced Liver Disease Study Group (2007). The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology* *45*, 797–805.
- Karaa, A., Thompson, K.J., McKillop, I.H., Clemens, M.G., and Schrum, L.W. (2008). S-adenosyl-L-methionine attenuates oxidative stress and hepatic stellate cell activation in an ethanol-LPS-induced fibrotic rat model. *Shock* *30*, 197–205.
- Karaca, G., Xie, G., Moylan, C., Swiderska-Syn, M., Guy, C.D., Krüger, L., Machado, M.V., Choi, S.S., Michelotti, G.A., Burkly, L.C., et al. (2015). Role of Fn14 in acute alcoholic steatohepatitis in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *308*, G325-334.
- Keller, A., Leidinger, P., Lange, J., Borries, A., Schroers, H., Scheffler, M., Lenhof, H.-P., Ruprecht, K., and Meese, E. (2009). Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS ONE* *4*, e7440.
- Kenny, P.J. (2014). Epigenetics, microRNA, and addiction. *Dialogues Clin Neurosci* *16*, 335–344.
- Keshavarzian, A., Farhadi, A., Forsyth, C.B., Rangan, J., Jakate, S., Shaikh, M., Banan, A., and Fields, J.Z. (2009). Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J. Hepatol.* *50*, 538–547.
- Kim, J.K., Kim, T.S., Basu, J., and Jo, E.-K. (2017). MicroRNA in innate immunity and autophagy during mycobacterial infection. *Cell. Microbiol.* *19*.
- Kim, W.R., Biggins, S.W., Kremers, W.K., Wiesner, R.H., Kamath, P.S., Benson, J.T., Edwards, E., and Therneau, T.M. (2008). Hyponatremia and mortality among patients on the liver-transplant waiting list. *N. Engl. J. Med.* *359*, 1018–1026.
- Kim, W.R., Lake, J.R., Smith, J.M., Skeans, M.A., Schladt, D.P., Edwards, E.B., Harper, A.M., Wainright, J.L., Snyder, J.J., Israni, A.K., et al. (2016). Liver. *Am. J. Transplant.* *16 Suppl 2*, 69–98.

- Kleine, M., Riemer, M., Krech, T., DeTemple, D., Jäger, M.D., Lehner, F., Manns, M.P., Klempnauer, J., Borlak, J., Bektas, H., et al. (2014). Explanted diseased livers - a possible source of metabolic competent primary human hepatocytes. *PLoS ONE* 9, e101386.
- Kong, X., Liu, F., and Gao, J. (2016). MiR-155 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells through the activation of PI3K/SGK3/ β -catenin signaling pathways. *Oncotarget* 7, 66051–66060.
- Kornek, M., and Schuppan, D. (2012). Microparticles: Modulators and biomarkers of liver disease. *J. Hepatol.* 57, 1144–1146.
- Kudo, M., Finn, R.S., Qin, S., Han, K.-H., Ikeda, K., Piscaglia, F., Baron, A., Park, J.-W., Han, G., Jassem, J., et al. (2018). Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 391, 1163–1173.
- Kumar, S., Batra, A., Kanthaje, S., Ghosh, S., and Chakraborti, A. (2017). Crosstalk between microRNA-122 and FOX family genes in HepG2 cells. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 242, 436–440.
- Ladeiro, Y., Couchy, G., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., Pelletier, L., Rebouissou, S., and Zucman-Rossi, J. (2008). MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology* 47, 1955–1963.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12, 735–739.
- Lamas-Paz, A., Hao, F., Nelson, L.J., Vázquez, M.T., Canals, S., Gómez Del Moral, M., Martínez-Naves, E., Nevzorova, Y.A., and Cubero, F.J. (2018). Alcoholic liver disease: Utility of animal models. *World J. Gastroenterol.* 24, 5063–5075.
- Lata, J. (2010). Chronic Liver Diseases as Liver Tumor Precursors. *DDI* 28, 596–599.
- Latorre, I., Leidinger, P., Backes, C., Domínguez, J., de Souza-Galvão, M.L., Maldonado, J., Prat, C., Ruiz-Manzano, J., Sánchez, F., Casas, I., et al. (2015). A novel whole-blood miRNA signature for a rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 45, 1173–1176.
- Laursen, L. (2014). A preventable cancer. *Nature* 516, S2-3.
- Lee, J., Padhye, A., Sharma, A., Song, G., Miao, J., Mo, Y.-Y., Wang, L., and Kemper, J.K. (2010). A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via microRNA-34a inhibition. *J. Biol. Chem.* 285, 12604–12611.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21, 4663–4670.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal* 23, 4051–4060.

Lee, Y.J., Lee, J.M., Lee, J.S., Lee, H.Y., Park, B.H., Kim, Y.H., Han, J.K., and Choi, B.I. (2015). Hepatocellular carcinoma: diagnostic performance of multidetector CT and MR imaging—a systematic review and meta-analysis. *Radiology* 275, 97–109.

Lefkowitz, J. (2005). Morphology of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis* 9, 37–53.

Leite, S.B., Roosens, T., El Taghdouini, A., Mannaerts, I., Smout, A.J., Najimi, M., Sokal, E., Noor, F., Chesne, C., and van Grunsven, L.A. (2016). Novel human hepatic organoid model enables testing of drug-induced liver fibrosis in vitro. *Biomaterials* 78, 1–10.

Leo, M.A., and Lieber, C.S. (1983). Hepatic fibrosis after long-term administration of ethanol and moderate vitamin A supplementation in the rat. *Hepatology* 3, 1–11.

Li, D., and Li, J. (2016). Association of miR-34a-3p/5p, miR-141-3p/5p, and miR-24 in Decidual Natural Killer Cells with Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion. *Med. Sci. Monit.* 22, 922–929.

Li, D.-P., Fan, J., Wu, Y.-J., Xie, Y.-F., Zha, J.-M., and Zhou, X.-M. (2017a). MiR-155 up-regulated by TGF- β promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Am J Transl Res* 9, 2956–2965.

Li, F., Duan, K., Wang, C., McClain, C., and Feng, W. (2016). Probiotics and Alcoholic Liver Disease: Treatment and Potential Mechanisms. *Gastroenterol Res Pract* 2016, 5491465.

Li, J., Ghazwani, M., Zhang, Y., Lu, J., Li, J., Fan, J., Gandhi, C.R., and Li, S. (2013). miR-122 regulates collagen production via targeting hepatic stellate cells and suppressing P4HA1 expression. *J. Hepatol.* 58, 522–528.

Li, J., Wan, X., Qiang, W., Li, T., Huang, W., Huang, S., Wu, D., and Li, Y. (2015a). MiR-29a suppresses prostate cell proliferation and induces apoptosis via KDM5B protein regulation. *Int J Clin Exp Med* 8, 5329–5339.

Li, M., He, Y., Zhou, Z., Ramirez, T., Gao, Y., Gao, Y., Ross, R.A., Cao, H., Cai, Y., Xu, M., et al. (2017b). MicroRNA-223 ameliorates alcoholic liver injury by inhibiting the IL-6-p47phox-oxidative stress pathway in neutrophils. *Gut* 66, 705–715.

Li, S., Chen, X., Zhang, H., Liang, X., Xiang, Y., Yu, C., Zen, K., Li, Y., and Zhang, C.-Y. (2009). Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. *J. Lipid Res.* 50, 1756–1765.

Li, X., Chen, Y., Wu, S., He, J., Lou, L., Ye, W., and Wang, J. (2015b). microRNA-34a and microRNA-34c promote the activation of human hepatic stellate cells by targeting peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Molecular Medicine Reports* 11, 1017–1024.

Lieber, C.S. (2005). Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis* 9, 1–35.

- Lieber, C., Jones, D., Medelson, J., and DeCarli, L. (1963). Fatty liver, hyperlipemia and hyperuricemia produced by prolonged alcohol consumption, despite adequate dietary intake. *Trans Assoc Am Physicians* 76, 289–300.
- Lim, K.-C., Chow, P.K.-H., Allen, J.C., Siddiqui, F.J., Chan, E.S.-Y., and Tan, S.-B. (2012). Systematic review of outcomes of liver resection for early hepatocellular carcinoma within the Milan criteria. *Br J Surg* 99, 1622–1629.
- Lin, Y.-C., Wang, F.-S., Yang, Y.-L., Chuang, Y.-T., and Huang, Y.-H. (2018). MicroRNA-29a mitigation of toll-like receptor 2 and 4 signaling and alleviation of obstructive jaundice-induced fibrosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 496, 880–886.
- Liu, H., You, S., Rong, Y., Wu, Y., Zhu, B., Wan, Z., Liu, W., Mao, P., and Xin, S. (2013). Newly established human liver cell line: a potential cell source for the bioartificial liver in the future. *Hum. Cell* 26, 155–161.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.-J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437–1441.
- Liu, K., Zhao, K., Wang, L., and Sun, E. (2018). Prognostic value of microRNA-155 in human carcinomas: An updated meta-analysis. *Clin. Chim. Acta* 479, 171–180.
- Liu, Z., Wang, Y., Borlak, J., and Tong, W. (2016). Mechanistically linked serum miRNAs distinguish between drug induced and fatty liver disease of different grades. *Sci Rep* 6, 23709.
- Livraghi, T., Salmi, A., Bolondi, L., Marin, G., Arienti, V., Monti, F., and Vettori, C. (1988). Small hepatocellular carcinoma: percutaneous alcohol injection--results in 23 patients. *Radiology* 168, 313–317.
- Livraghi, T., Meloni, F., Di Stasi, M., Rolle, E., Solbiati, L., Tinelli, C., and Rossi, S. (2008). Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Is resection still the treatment of choice? *Hepatology* 47, 82–89.
- Llovet, J.M., Brú, C., and Bruix, J. (1999). Prognosis of Hepatocellular Carcinoma: The BCLC Staging Classification. *Semin Liver Dis* 19, 329–338.
- Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., de Oliveira, A.C., Santoro, A., Raoul, J.-L., Forner, A., et al. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 359, 378–390.
- Longo, L., de Freitas, L.B.R., Santos, D., Grivicich, I., and Álvares-da-Silva, M.R. (2018). Sorafenib for Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Real-Life Experience. *Dig Dis* 36, 377–384.
- López-Riera, M., Conde, I., Quintas, G., Pedrola, L., Zaragoza, Á., Perez-Rojas, J., Salcedo, M., Benlloch, S., Castell, J.V., and Jover, R. (2018). Non-invasive prediction of NAFLD severity: a

comprehensive, independent validation of previously postulated serum microRNA biomarkers. *Sci Rep* 8, 10606.

Luca, A., García-Pagán, J.C., Bosch, J., Feu, F., Caballería, J., Groszmann, R.J., and Rodés, J. (1997). Effects of ethanol consumption on hepatic hemodynamics in patients with alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 112, 1284–1289.

Ludwig, N., Leidinger, P., Becker, K., Backes, C., Fehlmann, T., Pallasch, C., Rheinheimer, S., Meder, B., Stähler, C., Meese, E., et al. (2016). Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res.* 44, 3865–3877.

Ma, J., Li, T., Han, X., and Yuan, H. (2018). Knockdown of LncRNA ANRIL suppresses cell proliferation, metastasis, and invasion via regulating miR-122-5p expression in hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 144, 205–214.

Ma, J.-H., Bu, X., Wang, J.-J., and Xie, Y.-X. (2019). MicroRNA-29-3p Regulates Hepatocellular Carcinoma Progression Through NF- κ B Pathway. *Clin. Lab.* 65.

Maas, S.L.N., Breakefield, X.O., and Weaver, A.M. (2017). Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.* 27, 172–188.

MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V., and Doudna, J.A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 512–517.

Maddrey, W.C. (2000). Alcohol-induced liver disease. *Clin Liver Dis* 4, 115–131, vii.

Mahabadi, J.A., Sabzalipoor, H., Nikzad, H., Seyedhosseini, E., Enderami, S.E., Gheibi Hayat, S.M., and Sahebkar, A. (2019). The role of microRNAs in embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell differentiation in male germ cells. *J. Cell. Physiol.* 234, 12278–12289.

Mann, R., Smart, R., and Govoni, R. (2003). The Epidemiology of Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Research and Health* 27, 209–219.

Mao, J., DeMayo, F.J., Li, H., Abu-Elheiga, L., Gu, Z., Shaikenov, T.E., Kordari, P., Chirala, S.S., Heird, W.C., and Wakil, S.J. (2006). Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *PNAS* 103, 8552–8557.

Margue, C., Reinsbach, S., Philippidou, D., Beaume, N., Walters, C., Schneider, J.G., Nashan, D., Behrmann, I., and Kreis, S. (2015). Comparison of a healthy miRNome with melanoma patient miRNomes: are microRNAs suitable serum biomarkers for cancer? *Oncotarget* 6, 12110–12127.

Markopoulos, G.S., Roupakia, E., Tokamani, M., Alabasi, G., Sandaltzopoulos, R., Marcu, K.B., and Kolettas, E. (2018). Roles of NF- κ B Signaling in the Regulation of miRNAs Impacting on Inflammation in Cancer. *Biomedicines* 6.

Marot, A., Henrion, J., Knebel, J.-F., Moreno, C., and Deltenre, P. (2017). Alcoholic liver disease confers a worse prognosis than HCV infection and non-alcoholic fatty liver disease among patients with cirrhosis: An observational study. *PLoS ONE* 12, e0186715.

- Marrero, J.A., Kulik, L.M., Sirlin, C.B., Zhu, A.X., Finn, R.S., Abecassis, M.M., Roberts, L.R., and Heimbach, J.K. (2018). Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 68, 723–750.
- Mashima, R. (2015). Physiological roles of miR-155. *Immunology* 145, 323–333.
- Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., et al. (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317, 1764–1767.
- Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Andreola, S., Pulvirenti, A., Bozzetti, F., Montalto, F., Ammatuna, M., Morabito, A., and Gennari, L. (1996). Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* 334, 693–699.
- Mazzaferro, V., Bhoori, S., Sposito, C., Bongini, M., Langer, M., Miceli, R., and Mariani, L. (2011). Milan criteria in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an evidence-based analysis of 15 years of experience. *Liver Transpl.* 17 Suppl 2, S44-57.
- McDaniel, K., Herrera, L., Zhou, T., Francis, H., Han, Y., Levine, P., Lin, E., Glaser, S., Alpini, G., and Meng, F. (2014). The functional role of microRNAs in alcoholic liver injury. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 197–207.
- Mehta, G., Mookerjee, R.P., Sharma, V., and Jalan, R. (2015). Systemic inflammation is associated with increased intrahepatic resistance and mortality in alcohol-related acute-on-chronic liver failure. *Liver Int.* 35, 724–734.
- Meng, F., Glaser, S.S., Francis, H., Yang, F., Han, Y., Stokes, A., Staloch, D., McCarra, J., Liu, J., Venter, J., et al. (2012). Epigenetic regulation of miR-34a expression in alcoholic liver injury. *Am. J. Pathol.* 181, 804–817.
- Messner, S., Agarkova, I., Moritz, W., and Kelm, J.M. (2013). Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Arch. Toxicol.* 87, 209–213.
- Mestas, J., and Hughes, C.C.W. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* 172, 2731–2738.
- Mikkelsen, L.H., Andersen, M.K., Andreasen, S., Larsen, A.-C., Tan, Q., Toft, P.B., Wadt, K., and Heegaard, S. (2019). Global microRNA profiling of metastatic conjunctival melanoma. *Melanoma Res.*
- Momen-Heravi, F., Bala, S., Kodys, K., and Szabo, G. (2015a). Exosomes derived from alcohol-treated hepatocytes horizontally transfer liver specific miRNA-122 and sensitize monocytes to LPS. *Sci Rep* 5, 9991.
- Momen-Heravi, F., Saha, B., Kodys, K., Catalano, D., Satishchandran, A., and Szabo, G. (2015b). Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcoholic hepatitis. *J Transl Med* 13, 261.

- Morlando, M., Ballarino, M., Gromak, N., Pagano, F., Bozzoni, I., and Proudfoot, N.J. (2008). Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 902–909.
- Mouton, A.J., Maxi, J.K., Souza-Smith, F., Bagby, G.J., Gilpin, N.W., Molina, P.E., and Gardner, J.D. (2016). Alcohol Vapor Inhalation as a Model of Alcohol-Induced Organ Disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *40*, 1671–1678.
- Mulcahy, L.A., Pink, R.C., and Carter, D.R.F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* *3*.
- Muller, C. (2006). Liver, alcohol and gender. *Wien Med Wochenschr* *156*, 523–526.
- Muñoz, N.M., Katz, L.H., Shina, J.-H., Gi, Y.J., Menon, V.K., Gagea, M., Rashid, A., Chen, J., and Mishra, L. (2014). Generation of a mouse model of T-cell lymphoma based on chronic LPS challenge and TGF- β signaling disruption. *Genes Cancer* *5*, 348–352.
- Murphy, M.P. (2013). Mitochondrial dysfunction indirectly elevates ROS production by the endoplasmic reticulum. *Cell Metab.* *18*, 145–146.
- Myers, R.P., Shaheen, A.A.M., Faris, P., Aspinall, A.I., and Burak, K.W. (2013). Revision of MELD to include serum albumin improves prediction of mortality on the liver transplant waiting list. *PLoS ONE* *8*, e51926.
- Myers, R.P., Tandon, P., Ney, M., Meeberg, G., Faris, P., Shaheen, A.A.M., Aspinall, A.I., and Burak, K.W. (2014). Validation of the five-variable Model for End-stage Liver Disease (5vMELD) for prediction of mortality on the liver transplant waiting list. *Liver Int.* *34*, 1176–1183.
- Nan, Y.-M., Kong, L.-B., Ren, W.-G., Wang, R.-Q., Du, J.-H., Li, W.-C., Zhao, S.-X., Zhang, Y.-G., Wu, W.-J., Di, H.-L., et al. (2013). Activation of peroxisome proliferator activated receptor alpha ameliorates ethanol mediated liver fibrosis in mice. *Lipids Health Dis* *12*, 11.
- Naveau, S., Raynard, B., Ratziu, V., Abella, A., Imbert-Bismut, F., Messous, D., Beuzen, F., Capron, F., Thabut, D., Munteanu, M., et al. (2005). Biomarkers for the prediction of liver fibrosis in patients with chronic alcoholic liver disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *3*, 167–174.
- Neuman, M.G., Koren, G., and Tiribelli, C. (1993). In vitro assessment of the ethanol-induced hepatotoxicity on HepG2 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *197*, 932–941.
- Neuman, M.G., Shear, N.H., Cameron, R.G., Katz, G., and Tiribelli, C. (1999). Ethanol-induced apoptosis in vitro. *Clin. Biochem.* *32*, 547–555.
- Nguyen-Khac, E., Chatelain, D., Houchi, H., and Lloyd, V. (2014). Hépatite Alcoolique Aiguë sévère. *EMC Hépatologie* 1–9.
- Nguyen-Khac, E., Dejour, V., Sarba, R., Yzet, T., Chatelain, D., Marcq, I., Chivot, C., Papillon, C.A., Attencourt, C., and Houchi, H. (2018). [Severe acute alcoholic hepatitis]. *Presse Med.*

- Ning, S., Liu, H., Gao, B., Wei, W., Yang, A., Li, J., and Zhang, L. (2019). miR-155, miR-96 and miR-99a as potential diagnostic and prognostic tools for the clinical management of hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 18, 3381–3387.
- Niu, Z.-S., Niu, X.-J., Wang, W.-H., and Zhao, J. (2016). Latest developments in precancerous lesions of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 22, 3305–3314.
- Nottrott, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1108–1114.
- Novotna, A., Dorcakova, A., Vrzal, R., Pavek, P., and Dvorak, Z. (2011). Construction and characterization of hepatocyte nuclear factor HNF4alpha1 over-expressing cell line derived from human hepatoma HepG2 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 669, 45–50.
- Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y., and Lai, E.C. (2008). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 354–363.
- Oksuz, Z., Serin, M.S., Kaplan, E., Dogen, A., Tezcan, S., Aslan, G., Emekdas, G., Sezgin, O., Altintas, E., and Tiftik, E.N. (2015). Serum microRNAs; miR-30c-5p, miR-223-3p, miR-302c-3p and miR-17-5p could be used as novel non-invasive biomarkers for HCV-positive cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Mol. Biol. Rep.* 42, 713–720.
- OMS (2014a). Global status report on alcohol and health 2014.
- OMS (2014b). Global Status Report on noncommunicable diseases. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- OMS, B.R.E. (2016). European Detailed Mortality Database.
- Palli, D., Russo, A., Saieva, C., Salvini, S., Amorosi, A., and Decarli, A. (2000). Dietary and familial determinants of 10-year survival among patients with gastric carcinoma. *Cancer* 89, 1205–1213.
- Pastorino, J.G., and Hoek, J.B. (2000). Ethanol potentiates tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity in hepatoma cells and primary rat hepatocytes by promoting induction of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 31, 1141–1152.
- Pastorino, J.G., Shulga, N., and Hoek, J.B. (2003). TNF-alpha-induced cell death in ethanol-exposed cells depends on p38 MAPK signaling but is independent of Bid and caspase-8. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G503-516.
- Pessayre, D., Fromenty, B., and Mansouri, A. (2004). Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16, 1095–1105.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* 21, 533–542.
- Philips, C.A., Pande, A., Shasthry, S.M., Jamwal, K.D., Khillan, V., Chandel, S.S., Kumar, G., Sharma, M.K., Maiwall, R., Jindal, A., et al. (2017). Healthy Donor Fecal Microbiota

Transplantation in Steroid-Ineligible Severe Alcoholic Hepatitis: A Pilot Study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *15*, 600–602.

Poissonnier, L., Villain, G., Soncin, F., and Mattot, V. (2014). miR126-5p repression of ALCAM and SetD5 in endothelial cells regulates leucocyte adhesion and transmigration. *Cardiovasc Res* *102*, 436–447.

Prestigiacomo, V., Weston, A., Messner, S., Lampart, F., and Suter-Dick, L. (2017). Pro-fibrotic compounds induce stellate cell activation, ECM-remodelling and Nrf2 activation in a human 3D-multicellular model of liver fibrosis. *PLOS ONE* *12*, e0179995.

Qi, Y., Chen, X., Chan, C., Li, D., Yuan, C., Yu, F., Lin, M.C., Yew, D.T., Kung, H.-F., and Lai, L. (2008). Two-dimensional differential gel electrophoresis/analysis of diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* *122*, 2682–2688.

Rafacho, B.P.M., Stice, C.P., Liu, C., Greenberg, A.S., Ausman, L.M., and Wang, X.-D. (2015). Inhibition of diethylnitrosamine-initiated alcohol-promoted hepatic inflammation and precancerous lesions by flavonoid luteolin is associated with increased sirtuin 1 activity in mice. *Hepatobiliary Surg Nutr* *4*, 124–134.

Rajewsky, M.F., Dauber, W., and Frankenberg, H. (1966). Liver carcinogenesis by diethylnitrosamine in the rat. *Science* *152*, 83–85.

Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bentwich, Z., and Oren, M. (2007). Transcriptional Activation of miR-34a Contributes to p53-Mediated Apoptosis. *Molecular Cell* *26*, 731–743.

Rehm, J., Taylor, B., Mohapatra, S., Irving, H., Baliunas, D., Patra, J., and Roerecke, M. (2010). Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Rev* *29*, 437–445.

Roderburg, C., Urban, G.-W., Bettermann, K., Vucur, M., Zimmermann, H., Schmidt, S., Janssen, J., Koppe, C., Knolle, P., Castoldi, M., et al. (2011). Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* *53*, 209–218.

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* *14*, 1902–1910.

Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M.V., Couttet, P., Soond, D.R., van Dongen, S., Grocock, R.J., Das, P.P., Miska, E.A., et al. (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* *316*, 608–611.

Roth, N., and Quin, J. (2019). Histopathology of Alcohol-Related Liver Diseases. *Clin Liver Dis* *23*, 11–23.

Rozeik, M.S., Hammam, O.A., Ali, A.I., Magdy, M., Khalil, H., Anas, A., Abo El Hassan, A.A., Rahim, A.A., and El-Shabasy, A.I. (2017). Evaluation of CD44 and CD133 as markers of liver cancer stem cells in Egyptian patients with HCV-induced chronic liver diseases versus hepatocellular carcinoma. *Electron Physician* *9*, 4708–4717.

- Ruby, J.G., Stark, A., Johnston, W.K., Kellis, M., Bartel, D.P., and Lai, E.C. (2007). Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Res.* *17*, 1850–1864.
- Salvoza, N.C., Klinzing, D.C., Gopez-Cervantes, J., and Baclig, M.O. (2016). Association of Circulating Serum miR-34a and miR-122 with Dyslipidemia among Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS ONE* *11*, e0153497.
- Schober, A., Nazari-Jahantigh, M., Wei, Y., Bidzhekov, K., Gremse, F., Grommes, J., Megens, R.T.A., Heyll, K., Noels, H., Hristov, M., et al. (2014). MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing *Dlk1*. *Nature Medicine* *20*, 368–376.
- Schueller, F., Roy, S., Loosen, S.H., Alder, J., Koppe, C., Schneider, A.T., Wandrer, F., Bartel, H., Vucur, M., Mi, Q.-S., et al. (2017). miR-223 represents a biomarker in acute and chronic liver injury. *Clin. Sci.* *131*, 1971–1987.
- Schyschka, L., Sánchez, J.J.M., Wang, Z., Burkhardt, B., Müller-Vieira, U., Zeilinger, K., Bachmann, A., Nadalin, S., Damm, G., and Nussler, A.K. (2013). Hepatic 3D cultures but not 2D cultures preserve specific transporter activity for acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Arch. Toxicol.* *87*, 1581–1593.
- Seitz, H.K., Bataller, R., Cortez-Pinto, H., Gao, B., Gual, A., Lackner, C., Mathurin, P., Mueller, S., Szabo, G., and Tsukamoto, H. (2018). Alcoholic liver disease. *Nat Rev Dis Primers* *4*, 16.
- Sengupta, S., and Parikh, N.D. (2017). Biomarker development for hepatocellular carcinoma early detection: current and future perspectives. *Hepatic Oncology* *4*, 111–122.
- Shaker, O.G., and Senousy, M.A. (2017). Serum microRNAs as predictors for liver fibrosis staging in hepatitis C virus-associated chronic liver disease patients. *J. Viral Hepat.* *24*, 636–644.
- Shear, N.H., Landau, M., Malkiewicz, I., Katz, G.G., and Neuman, M.G. (1999). Ethanol-modulated cytokine production and expression in skin cells exposed to methotrexate. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* *12*, 64–78.
- Shen, Z., Liang, X., Rogers, C.Q., Rideout, D., and You, M. (2009). Involvement of adiponectin-SIRT1-AMPK signaling in the protective action of rosiglitazone against alcoholic fatty liver in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* *298*, G364–G374.
- Singh, S.K., Kagalwala, M.N., Parker-Thornburg, J., Adams, H., and Majumder, S. (2008). REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* *453*, 223–227.
- Singh, S.K., Marisetty, A., Sathyan, P., Kagalwala, M., Zhao, Z., and Majumder, S. (2015). REST-miR-21-SOX2 axis maintains pluripotency in E14Tg2a.4 embryonic stem cells. *Stem Cell Res* *15*, 305–311.
- Smith, C.M., Nolan, C.K., Edwards, M.A., Hatfield, J.B., Stewart, T.W., Ferguson, S.S., Lecluyse, E.L., and Sahi, J. (2012). A comprehensive evaluation of metabolic activity and intrinsic

clearance in suspensions and monolayer cultures of cryopreserved primary human hepatocytes. *J Pharm Sci* 101, 3989–4002.

Soares do Amaral, N., Cruz E Melo, N., de Melo Maia, B., and Malagoli Rocha, R. (2016). Noncoding RNA Profiles in Tobacco- and Alcohol-Associated Diseases. *Genes (Basel)* 8.

Soldin, O.P., and Mattison, D.R. (2009). Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet* 48, 143–157.

Song, K., Han, C., Dash, S., Balart, L.A., and Wu, T. (2015). MiR-122 in hepatitis B virus and hepatitis C virus dual infection. *World J Hepatol* 7, 498–506.

Starkel, P., and Leclercq, I.A. (2011). Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25, 319–333.

Szabo, G., and Satishchandran, A. (2015). MicroRNAs in alcoholic liver disease. *Semin. Liver Dis.* 35, 36–42.

Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.-R., Ueno, Y., Zheng, Y.-W., Koike, N., et al. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499, 481–484.

Talaei-Khozani, T., Borhani-Haghighi, M., Ayatollahi, M., and Vojdani, Z. (2015). An in vitro model for hepatocyte-like cell differentiation from Wharton's jelly derived-mesenchymal stem cells by cell-base aggregates. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 8, 188–199.

Tang, L.Y., Chen, Y., Rui, B.B., and Hu, C.M. (2016). Resveratrol ameliorates lipid accumulation in HepG2 cells, associated with down-regulation of lipin1 expression. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 94, 185–189.

Tang, Y., Banan, A., Forsyth, C.B., Fields, J.Z., Lau, C.K., Zhang, L.J., and Keshavarzian, A. (2008a). Effect of Alcohol on miR-212 Expression in Intestinal Epithelial Cells and Its Potential Role in Alcoholic Liver Disease. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 32, 355–364.

Tang, Y., Banan, A., Forsyth, C.B., Fields, J.Z., Lau, C.K., Zhang, L.J., and Keshavarzian, A. (2008b). Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 355–364.

Tang, Y., Zhang, L., Forsyth, C.B., Shaikh, M., Song, S., and Keshavarzian, A. (2015). The Role of miR-212 and iNOS in Alcohol-Induced Intestinal Barrier Dysfunction and Steatohepatitis. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 39, 1632–1641.

Tapani, E., Taavitsainen, M., Lindros, K., Vehmas, T., and Lehtonen, E. (1996). Toxicity of ethanol in low concentrations. Experimental evaluation in cell culture. *Acta Radiol* 37, 923–926.

Tarasov, V., Jung, P., Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Meister, G., and Hermeking, H. (2007). Differential Regulation of microRNAs by p53 Revealed by Massively Parallel Sequencing: miR-34a is a p53 Target That Induces Apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* 6, 1586–1593.

- Teschke, R. (2018). Alcoholic steatohepatitis (ASH) and alcoholic hepatitis (AH): cascade of events, clinical aspects, and pharmacotherapy options. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 19, 779–793.
- Testa, U., Pelosi, E., Castelli, G., and Labbaye, C. (2017). miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development. *Noncoding RNA* 3.
- Thomas, M.B., O’Beirne, J.P., Furuse, J., Chan, A.T.C., Abou-Alfa, G., and Johnson, P. (2008). Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: cytotoxic chemotherapy, targeted therapy and immunotherapy. *Ann. Surg. Oncol.* 15, 1008–1014.
- Thomson, D.W., Bracken, C.P., and Goodall, G.J. (2011). Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res.* 39, 6845–6853.
- Thurnherr, T., Mah, W.-C., Lei, Z., Jin, Y., Rozen, S.G., and Lee, C.G. (2016). Differentially Expressed miRNAs in Hepatocellular Carcinoma Target Genes in the Genetic Information Processing and Metabolism Pathways. *Sci Rep* 6, 20065.
- Thursz, M., Gual, A., Lackner, C., Mathurin, P., Moreno, C., Spahr, L., Sterneck, M., and Cortez-Pinto, H. (2018). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of alcohol-related liver disease. *Journal of Hepatology* 69, 154–181.
- Tian, Y.-W., Shen, Q., Jiang, Q.-F., Wang, Y.-X., Li, K., and Xue, H.-Z. (2017). Decreased levels of miR-34a and miR-217 act as predictor biomarkers of aggressive progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Minerva Med.* 108, 108–113.
- Tiao, M.-M., Wang, F.-S., Huang, L.-T., Chuang, J.-H., Kuo, H.-C., Yang, Y.-L., and Huang, Y.-H. (2014). MicroRNA-29a protects against acute liver injury in a mouse model of obstructive jaundice via inhibition of the extrinsic apoptosis pathway. *Apoptosis* 19, 30–41.
- Toivola, D.M., Ku, N.-O., Resurreccion, E.Z., Nelson, D.R., Wright, T.L., and Omary, M.B. (2004). Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease. *Hepatology* 40, 459–466.
- Trevisani, F., D’Intino, P.E., Morselli-Labate, A.M., Mazzella, G., Accogli, E., Caraceni, P., Domenicali, M., De Notariis, S., Roda, E., and Bernardi, M. (2001). Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J. Hepatol.* 34, 570–575.
- Treyer, A., and Müsch, A. (2013). Hepatocyte polarity. *Compr Physiol* 3, 243–287.
- Trinchet, J.C., and Ganne-Carrié, N. (2006). Faut-il dépister le carcinome hépatocellulaire ? *Gastroenterol Clin Biol* 30, 880–886.
- Trinchet, J.-C., Chaffaut, C., Bourcier, V., Degos, F., Henrion, J., Fontaine, H., Roulot, D., Mallat, A., Hillaire, S., Cales, P., et al. (2011). Ultrasonographic surveillance of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a randomized trial comparing 3- and 6-month periodicities. *Hepatology* 54, 1987–1997.

Tsai, W.-C., Hsu, S.-D., Hsu, C.-S., Lai, T.-C., Chen, S.-J., Shen, R., Huang, Y., Chen, H.-C., Lee, C.-H., Tsai, T.-F., et al. (2012). MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J. Clin. Invest.* *122*, 2884–2897.

Tsuchiya, M., Ji, C., Kosyk, O., Shymonyak, S., Melnyk, S., Kono, H., Tryndyak, V., Muskhelishvili, L., Pogribny, I.P., Kaplowitz, N., et al. (2012). Interstrain differences in liver injury and one-carbon metabolism in alcohol-fed mice. *Hepatology* *56*, 130–139.

Tsukamoto, H., Reidelberger, R.D., French, S.W., and Largman, C. (1984). Long-term cannulation model for blood sampling and intragastric infusion in the rat. *Am. J. Physiol.* *247*, R595-599.

Tsukamoto, H., French, S.W., Benson, N., Delgado, G., Rao, G.A., Larkin, E.C., and Largman, C. (1985). Severe and progressive steatosis and focal necrosis in rat liver induced by continuous intragastric infusion of ethanol and low fat diet. *Hepatology* *5*, 224–232.

Tsukamoto, H., Towner, S.J., Ciofalo, L.M., and French, S.W. (1986). Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high fat diet. *Hepatology* *6*, 814–822.

Tsukamoto, H., Horne, W., Kamimura, S., Niemelä, O., Parkkila, S., Ylä-Herttua, S., and Brittenham, G.M. (1995). Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J. Clin. Invest.* *96*, 620–630.

Uchino, K., Takeshita, F., Takahashi, R.-U., Kosaka, N., Fujiwara, K., Naruoka, H., Sonoke, S., Yano, J., Sasaki, H., Nozawa, S., et al. (2013). Therapeutic effects of microRNA-582-5p and -3p on the inhibition of bladder cancer progression. *Mol. Ther.* *21*, 610–619.

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 654–659.

Vella, M.C., Choi, E.-Y., Lin, S.-Y., Reinert, K., and Slack, F.J. (2004). The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the *lin-41* 3'UTR. *Genes Dev.* *18*, 132–137.

Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., et al. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 2257–2261.

van Vugt, J.L.A., Alferink, L.J.M., Buettner, S., Gaspersz, M.P., Bot, D., Darwish Murad, S., Feshtali, S., van Ooijen, P.M.A., Polak, W.G., Porte, R.J., et al. (2017). A model including sarcopenia surpasses the MELD score in predicting waiting list mortality in cirrhotic liver transplant candidates: a competing risk analysis in a national cohort. *J. Hepatol.*

Wan, J., Benkdane, M., Teixeira-Clerc, F., Bonnafous, S., Louvet, A., Lafdil, F., Pecker, F., Tran, A., Gual, P., Mallat, A., et al. (2014). M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *59*, 130–142.

- Wan, Y., McDaniel, K., Wu, N., Ramos-Lorenzo, S., Glaser, T., Venter, J., Francis, H., Kennedy, L., Sato, K., Zhou, T., et al. (2017a). Regulation of Cellular Senescence by miR-34a in Alcoholic Liver Injury. *The American Journal of Pathology* *187*, 2788–2798.
- Wan, Y., Cui, R., Gu, J., Zhang, X., Xiang, X., Liu, C., Qu, K., and Lin, T. (2017b). Identification of Four Oxidative Stress-Responsive MicroRNAs, miR-34a-5p, miR-1915-3p, miR-638, and miR-150-3p, in Hepatocellular Carcinoma. *Oxid Med Cell Longev* *2017*, 5189138.
- Wang, F., Wang, J., Ju, L., Chen, L., Cai, W., and Yang, J. (2018a). Diagnostic and prognostic potential of serum miR-132/212 cluster in patients with hepatocellular carcinoma. *Ann. Clin. Biochem.* *55*, 576–582.
- Wang, J., Liu, S., Li, J., Zhao, S., and Yi, Z. (2019a). Roles for miRNAs in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* *10*, 197.
- Wang, J.-Y., Zhang, Q., Wang, D.-D., Yan, W., Sha, H.-H., Zhao, J.-H., Yang, S.-J., Zhang, H., Hou, J.-C., Xu, H.-Z., et al. (2018b). MiR-29a: a potential therapeutic target and promising biomarker in tumors. *Biosci. Rep.* *38*.
- Wang, M., Yu, F., Ding, H., Wang, Y., Li, P., and Wang, K. (2019b). Emerging Function and Clinical Values of Exosomal MicroRNAs in Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* *16*, 791–804.
- Wang, Y., Tong, J., Chang, B., Wang, B., Zhang, D., and Wang, B. (2014). Effects of alcohol on intestinal epithelial barrier permeability and expression of tight junction-associated proteins. *Mol Med Rep* *9*, 2352–2356.
- Weber, L.W.D., Boll, M., and Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit. Rev. Toxicol.* *33*, 105–136.
- Werner, T.V., Hart, M., Nickels, R., Kim, Y.-J., Menger, M.D., Bohle, R.M., Keller, A., Ludwig, N., and Meese, E. (2017). MiR-34a-3p alters proliferation and apoptosis of meningioma cells in vitro and is directly targeting SMAD4, FRAT1 and BCL2. *Aging (Albany NY)* *9*, 932–954.
- Westra, I.M., Pham, B.T., Groothuis, G.M.M., and Olinga, P. (2013). Evaluation of fibrosis in precision-cut tissue slices. *Xenobiotica* *43*, 98–112.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* *75*, 855–862.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* *11*, 228–234.
- Wong, F.W., Chan, W.Y., and Lee, S.S. (1998). Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *153*, 109–118.
- Wong, Q.W.-L., Lung, R.W.-M., Law, P.T.-Y., Lai, P.B.-S., Chan, K.Y.-Y., To, K.-F., and Wong, N. (2008). MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology* *135*, 257–269.

Wotschovsky, Z., Liep, J., Meyer, H.-A., Jung, M., Wagner, I., Disch, A.C., Schaser, K.D., Melcher, I., Kilic, E., Busch, J., et al. (2012). Identification of metastamirs as metastasis-associated microRNAs in clear cell renal cell carcinomas. *Int. J. Biol. Sci.* *8*, 1363–1374.

Wu, H., Ng, R., Chen, X., Steer, C.J., and Song, G. (2016). MicroRNA-21 is a potential link between non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma via modulation of the HBP1-p53-Srebp1c pathway. *Gut* *65*, 1850–1860.

Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 4034–4039.

Wu, N., McDaniel, K., Zhou, T., Ramos-Lorenzo, S., Wu, C., Huang, L., Chen, D., Annable, T., Francis, H., Glaser, S., et al. (2018). Knockout of microRNA-21 attenuates alcoholic hepatitis through the VHL/NF- κ B signaling pathway in hepatic stellate cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* *315*, G385–G398.

Wu, T., Liu, Y., Fu, Y., Liu, X., and Zhou, X. (2014). Direct evidence of sirtuin downregulation in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Ann. Clin. Lab. Sci.* *44*, 410–418.

Xia, C., Shui, L., Lou, G., Ye, B., Zhu, W., Wang, J., Wu, S., Xu, X., Mao, L., Xu, W., et al. (2017). 0404 inhibits hepatocellular carcinoma through a p53/miR-34a/SIRT1 positive feedback loop. *Sci Rep* *7*, 4396.

Xiang, L.-Y., Ou, H.-H., Liu, X.-C., Chen, Z.-J., Li, X.-H., Huang, Y., and Yang, D.-H. (2017). Loss of tumor suppressor miR-126 contributes to the development of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma metastasis through the upregulation of ADAM9. *Tumour Biol.* *39*, 1010428317709128.

Xiao, J., Bei, Y., Liu, J., Dimitrova-Shumkovska, J., Kuang, D., Zhou, Q., Li, J., Yang, Y., Xiang, Y., Wang, F., et al. (2016). miR-212 downregulation contributes to the protective effect of exercise against non-alcoholic fatty liver via targeting FGF-21. *J. Cell. Mol. Med.* *20*, 204–216.

Xu, Y., Huang, J., Ma, L., Shan, J., Shen, J., Yang, Z., Liu, L., Luo, Y., Yao, C., and Qian, C. (2016). MicroRNA-122 confers sorafenib resistance to hepatocellular carcinoma cells by targeting IGF-1R to regulate RAS/RAF/ERK signaling pathways. *Cancer Lett.* *371*, 171–181.

Yamada, H., Suzuki, K., Ichino, N., Ando, Y., Sawada, A., Osakabe, K., Sugimoto, K., Ohashi, K., Teradaira, R., Inoue, T., et al. (2013). Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clin. Chim. Acta* *424*, 99–103.

Yamakuchi, M., Ferlito, M., and Lowenstein, C.J. (2008). miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *PNAS* *105*, 13421–13426.

Yan, A.W., Fouts, D.E., Brandl, J., Stärkel, P., Torralba, M., Schott, E., Tsukamoto, H., Nelson, K.E., Brenner, D.A., and Schnabl, B. (2011). Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* *53*, 96–105.

Yan, X.-L., Jia, Y.-L., Chen, L., Zeng, Q., Zhou, J.-N., Fu, C.-J., Chen, H.-X., Yuan, H.-F., Li, Z.-W., Shi, L., et al. (2013). Hepatocellular carcinoma-associated mesenchymal stem cells promote

- hepatocarcinoma progression: role of the S100A4-miR155-SOCS1-MMP9 axis. *Hepatology* 57, 2274–2286.
- Yang, J.-S., Phillips, M.D., Betel, D., Mu, P., Ventura, A., Siepel, A.C., Chen, K.C., and Lai, E.C. (2011). Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA* 17, 312–326.
- Yanguas, S.C., Cogliati, B., Willebrords, J., Maes, M., Colle, I., van den Bossche, B., de Oliveira, C.P.M.S., Andraus, W., Alves, V.A.F., Leclercq, I., et al. (2016). Experimental models of liver fibrosis. *Arch. Toxicol.* 90, 1025–1048.
- Ye, D., Guo, S., Al-Sadi, R., and Ma, T.Y. (2011). MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability. *Gastroenterology* 141, 1323–1333.
- Ye, D., Zhang, T., Lou, G., and Liu, Y. (2018). Role of miR-223 in the pathophysiology of liver diseases. *Exp. Mol. Med.* 50, 128.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011–3016.
- Yin, D., Wang, Y., Sai, W., Zhang, L., Miao, Y., Cao, L., Zhai, X., Feng, X., and Yang, L. (2016). HBx-induced miR-21 suppresses cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-12. *Oncol. Rep.* 36, 2305–2312.
- Yin, H., Hu, M., Zhang, R., Shen, Z., Flatow, L., and You, M. (2012). MicroRNA-217 Promotes Ethanol-induced Fat Accumulation in Hepatocytes by Down-regulating SIRT1. *J. Biol. Chem.* 287, 9817–9826.
- You, M., Fischer, M., Deeg, M.A., and Crabb, D.W. (2002). Ethanol Induces Fatty Acid Synthesis Pathways by Activation of Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP). *J. Biol. Chem.* 277, 29342–29347.
- You, M., Matsumoto, M., Pacold, C.M., Cho, W.K., and Crabb, D.W. (2004). The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver. *Gastroenterology* 127, 1798–1808.
- Yu, F., Geng, W., Dong, P., Huang, Z., and Zheng, J. (2018). LncRNA-MEG3 inhibits activation of hepatic stellate cells through SMO protein and miR-212. *Cell Death Dis* 9, 1014.
- Zeilinger, K., Freyer, N., Damm, G., Seehofer, D., and Knöspel, F. (2016). Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 241, 1684–1698.
- Zeitoun, J.-D., Chryssostalis, A., and Lefevre, J. (2014). *Hépatologie Gastro-Entérologie, Chirurgie Digestive* (Editions Vernazobres-Gregó).
- Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* 32, 4776–4785.
- Zhang, H., Bai, M., Deng, T., Liu, R., Wang, X., Qu, Y., Duan, J., Zhang, L., Ning, T., Ge, S., et al. (2016a). Cell-derived microvesicles mediate the delivery of miR-29a/c to suppress angiogenesis in gastric carcinoma. *Cancer Lett.* 375, 331–339.

- Zhang, L., Wang, W., Li, X., He, S., Yao, J., Wang, X., Zhang, D., and Sun, X. (2016b). MicroRNA-155 promotes tumor growth of human hepatocellular carcinoma by targeting ARID2. *Int. J. Oncol.* *48*, 2425–2434.
- Zhang, R., Shen, L., Zhao, L., Guan, Z., Chen, Q., and Li, W. (2018a). Combined transarterial chemoembolization and microwave ablation versus transarterial chemoembolization in BCLC stage B hepatocellular carcinoma. *Diagn Interv Radiol* *24*, 219–224.
- Zhang, Y., Yang, L., Wang, S., Liu, Z., and Xiu, M. (2018b). MiR-29a suppresses cell proliferation by targeting SIRT1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomark* *22*, 151–159.
- Zhao, Q., Zhou, H., Liu, Q., Cao, Y., Wang, G., Hu, A., Ruan, L., Wang, S., Bo, Q., Chen, W., et al. (2016). Prognostic value of the expression of cancer stem cell-related markers CD133 and CD44 in hepatocellular carcinoma: From patients to patient-derived tumor xenograft models. *Oncotarget* *7*, 47431–47443.
- Zheng, H., Zou, A.E., Saad, M.A., Wang, X.Q., Kwok, J.G., Korrapati, A., Li, P., Kisseleva, T., Wang-Rodriguez, J., and Ongkeko, W.M. (2017). Alcohol-dysregulated microRNAs in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* *12*, e0178547.
- Zhong, Z., and Lemasters, J.J. (2018). A Unifying Hypothesis Linking Hepatic Adaptations for Ethanol Metabolism to the Proinflammatory and Profibrotic Events of Alcoholic Liver Disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*
- Zhong, S., Li, W., Chen, Z., Xu, J., and Zhao, J. (2013). MiR-222 and miR-29a contribute to the drug-resistance of breast cancer cells. *Gene* *531*, 8–14.
- Zhou, L., Yang, Z.-X., Song, W.-J., Li, Q.-J., Yang, F., Wang, D.-S., Zhang, N., and Dou, K.-F. (2013). MicroRNA-21 regulates the migration and invasion of a stem-like population in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* *43*, 661–669.
- Zhou, Q., Souba, W.W., Croce, C.M., and Verne, G.N. (2010). MicroRNA-29a regulates intestinal membrane permeability in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* *59*, 775–784.
- Zhu, A.X., Park, J.O., Ryoo, B.-Y., Yen, C.-J., Poon, R., Pastorelli, D., Blanc, J.-F., Chung, H.C., Baron, A.D., Pfiffer, T.E.F., et al. (2015). Ramucirumab versus placebo as second-line treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma following first-line therapy with sorafenib (REACH): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *16*, 859–870.
- Zhu, J., Zhang, Z., Zhang, Y., Li, W., Zheng, W., Yu, J., Wang, B., Chen, L., Zhuo, Q., Chen, L., et al. (2018). MicroRNA-212 activates hepatic stellate cells and promotes liver fibrosis via targeting SMAD7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *496*, 176–183.
- Zhu, X.-C., Dong, Q.-Z., Zhang, X.-F., Deng, B., Jia, H.-L., Ye, Q.-H., Qin, L.-X., and Wu, X.-Z. (2012). microRNA-29a suppresses cell proliferation by targeting SPARC in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* *30*, 1321–1326.

Zhuang, C., Jiang, W., Huang, D., Xu, L., Yang, Q., Zheng, L., Wang, X., and Hu, L. (2016). Serum miR-21, miR-26a and miR-101 as potential biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* *40*, 386–396.

Zhuang, G., Meng, C., Guo, X., Cheruku, P.S., Shi, L., Xu, H., Li, H., Wang, G., Evans, A.R., Safe, S., et al. (2012). A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. *Circulation* *125*, 2892–2903.

Zou, Q., Mao, Y., Hu, L., Wu, Y., and Ji, Z. (2014). miRClassify: An advanced web server for miRNA family classification and annotation. *Computers in Biology and Medicine* *45*, 157–160.

Résumé

La maladie du foie liée à l'alcool (MAF) est un continuum pathologique se développant en réponse à une consommation chronique d'alcool. Elle progresse de manière asymptomatique jusqu'à l'apparition de formes avancées comme la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire (CHC), qui s'accompagnent d'une surmortalité importante. Le développement paucisymptomatique du CHC retarde le diagnostic qui est posé dans 50-60% des cas à un stade intermédiaire voir avancé. Cela limite *de facto* les traitements curatifs, ce qui réduit la survie à 5 ans à 16 et 11 mois pour respectivement les formes intermédiaires et avancées. Dans ce contexte il semble nécessaire de développer de nouveaux outils de suivi permettant un diagnostic précoce afin d'améliorer le pronostic. Les microARNs, qui sont des régulateurs épigénétiques que l'on retrouve de manière stable dans la circulation sanguine, apparaissent comme des biomarqueurs pertinents dans le suivi et le diagnostic de nombreuses pathologies. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à certains miARNs sélectionnés dans la littérature pour leur lien avec le CHC, et avons évalué la faisabilité et l'intérêt d'un protocole de quantification de miARNs circulants dans le cas de la MAF et du CHC lié à l'alcool. Nous avons ainsi démontré dans un modèle cellulaire qu'une exposition chronique à l'alcool induit une surproduction des miARNs étudiés. Dans un modèle murin d'exposition chronique à l'alcool, nous avons observé différentes variations de ces miARNs qui peuvent être liées au protocole d'exposition. Enfin, dans une étude clinique, nous avons observé une augmentation significative de ces miARNs chez des patients atteints de MAF et de CHC lié à l'alcool ce qui nous a permis d'établir des seuils de quantification permettant de discerner les cas de CHC des cas de MAF. Ces résultats démontrent la faisabilité d'un tel protocole et le potentiel de ces miARNs comme biomarqueurs de suivi de la MAF.

Mots-clés: Maladie du foie liée à l'alcool, Carcinome hépatocellulaire, microARN, Trouble lié à l'usage d'alcool

Abstract

Alcohol-related liver disease (ALD) is a spectrum of disorders which appears after chronic alcohol consumption. ALD has a quiet development until advanced forms as cirrhosis or hepatocellular carcinoma (HCC), both characterized by a high mortality rate. The lack of early clinical symptoms induces a late diagnostic in 50-60% of HCC cases. Even though several therapies are available, late diagnostic cases have a poor prognosis and a 5-year survival rate of 16 and 11 months, respectively for intermediate and advanced HCC. New following-up tools allowing an early diagnostic and a better prognosis appear necessary. Over the recent years, a lot of interest has been accorded to microRNAs in that matter for various diseases, as miRNAs are small epigenetics factors find stable in blood circulation. During this thesis, we have studied some miRNAs selected from literature for their link to HCC, and assessed feasibility and relevance of a circulating miRNAs quantification protocol for ALD follow-up. We observed in a cellular model of chronic alcohol exposure an overproduction of all studied miRNAs. In an animal model of chronic alcohol exposure we observed variations of miRNAs that can be linked to given treatments. At last, we observed a significant increase of all miRNAs in serum of patients suffering from ALD and HCC-related to alcohol. Those results demonstrated the feasibility of such a protocol and the potential of these miRNAs as biomarkers for the follow-up of ALD cases.

Keywords: Alcohol-related liver disease, Hepatocellular carcinoma, microRNA, Alcohol use disorder