



HAL
open science

**Les cellules stellaires : cible thérapeutique pour la
fibrose hépatique : découverte de l'association
hypertrophie des cellules stellaires/fibrose hépatique :
stratégies thérapeutiques par ARN interférence**

Nour El Houda Djerir

► **To cite this version:**

Nour El Houda Djerir. Les cellules stellaires : cible thérapeutique pour la fibrose hépatique : découverte de l'association hypertrophie des cellules stellaires/fibrose hépatique : stratégies thérapeutiques par ARN interférence. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP5008 . tel-03881719

HAL Id: tel-03881719

<https://theses.hal.science/tel-03881719v1>

Submitted on 2 Dec 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.

Université de Paris

École doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries

(MTCI ED 563)

Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS)

Les cellules stellaires : cible thérapeutique pour la fibrose hépatique

*Découverte de l'association hypertrophie des cellules
stellaires/fibrose hépatique*

Stratégies thérapeutiques par ARN interférence

Par Nour El Houda DJERIR

Thèse de doctorat de Pharmacologie

Dirigée par le Dr. Virginie Escriou

Présentée et soutenue publiquement le 19 novembre 2020

Devant un jury composé de

Pr. Chantal Housset, PU-PH, Sorbonne Université
Dr. Philippe Gual, DR, Université Côte d'Azur
Dr. Bernard Verrier, DR, Université de Lyon-UCBL-1
Dr. Régis Tournebize, CR-HDR, Sorbonne université
Dr. Céline Hoffmann, CR, Université de Paris
Dr. Virginie Escriou, DR, Université de Paris

Présidente du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Co-encadrante
Directrice de thèse



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/3.0/fr/>

Titre : Les cellules stellaires : cible thérapeutique pour la fibrose hépatique.

- Découverte de l'association hypertrophie des cellules stellaires/fibrose hépatique
- Stratégies thérapeutiques par ARN interférence

Résumé : La fibrose hépatique, caractérisée par un dépôt excessif de matrice extracellulaire, est une conséquence majeure des maladies hépatiques chroniques comme la stéato-hépatite non alcoolique (NASH) qui connaît une incidence croissante en raison de l'augmentation de la prévalence du syndrome métabolique. Aucun traitement efficace n'existe actuellement pour bloquer le processus de fibrogénèse pouvant conduire à une cirrhose ou à un hépatocarcinome. Les cellules stellaires hépatiques (HSCs) jouent un rôle clé dans la fibrose, en se différenciant en myofibroblastes responsables de la production excessive de collagène. Dans un premier temps, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence la présence d'amas de HSCs hypertrophiées, contenant une accumulation de gouttelettes de rétinoides, dans un modèle murin de fibrose métabolique (CDAHFD). Ces cellules présentent un phénotype particulier caractérisé par l'expression simultanée de marqueurs de HSCs quiescentes et activées et sont colocalisées avec les fibres de collagène. Une hypertrophie de HSCs a également été mise en évidence dans 3 autres

modèles murins de fibrose et chez des patients présentant une fibrose liée à différentes étiologies (obésité, NASH, hépatite C et alcoolisme). De plus, une corrélation positive significative a été mise en évidence entre le stade de fibrose et le score d'hypertrophie des HSCs dans une cohorte de patients obèses atteints de fibrose hépatique. Ces résultats suggèrent que les HSCs hypertrophiées sont étroitement associées à la fibrose hépatique. Dans un second temps, plusieurs formulations de lipoplexes ont été développées pour l'administration de siRNA anti collagène 1 à des HSCs *in vivo*. Sur des souris saines, malgré l'absence de ligand de ciblage, la modification de la composition lipidique du lipoplexe permet d'orienter le siRNA vers un type cellulaire particulier. Les résultats préliminaires montrent que l'ajout de cholestérol au lipoplexe permet d'augmenter l'internalisation des siRNA par les HSCs. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse et évaluer l'efficacité thérapeutique de ces vecteurs sur des souris CDAHFD.

Mots clés : Fibrose hépatique, NASH, HSCs, Hypertrophie, modèle métabolique, siRNA, lipoplexes.

Title: Hepatic stellate cells: therapeutic target for liver fibrosis

- Discovery of the association stellate cell hypertrophy / liver fibrosis
- Therapeutic strategies by RNA interference

Abstract: Hepatic fibrosis, characterized by excessive deposition of extracellular matrix, is a major consequence of chronic liver diseases such as non-alcoholic steatohepatitis (NASH) which is undergoing a dramatic evolution due to the increased prevalence of metabolic syndrome. No effective treatment currently exists to block the process of fibrogenesis that can lead to cirrhosis or hepato-carcinoma. Hepatic stellate cells (HSC) play a key role in fibrosis, by dedifferentiating into myofibroblasts responsible for the excessive collagen production. Initially, this thesis work revealed the presence of hypertrophied HSCs clusters, containing an accumulation of retinoid droplets, in a murine model of metabolic fibrosis (CDAHFD). These cells exhibit a particular phenotype characterized by simultaneous expression of quiescent and activated HSCs markers and are colocalized with

collagen fibers. The presence of HSC hypertrophy was also demonstrated in 3 other murine models of fibrosis and in patients with fibrosis associated with different etiologies (obesity, NASH, hepatitis C and alcoholism). In addition, a significant positive correlation was established between the stage of fibrosis and the score of HSC hypertrophy in a cohort of obese patients with hepatic fibrosis. These results suggest that HSC hypertrophy is associated with hepatic fibrosis. Secondly, several formulations of lipoplexes were developed to deliver siRNA anti-collagen 1 to HSCs *in vivo*. In healthy mice, despite the absence of a targeting ligand, the modification of lipoplex lipid composition allows to target siRNA to a specific cell type. Preliminary results show that the addition of cholesterol into the lipoplex can increase the level of siRNA internalization by HSCs. Further studies are required to confirm this hypothesis and to assess the therapeutic efficacy of these vectors in CDAHFD mice.

Mots clés : Liver fibrosis, NASH, HSCs, Hypertrophy, metabolic model, siRNA, lipoplexes.

« A mes parents et mon mari... »

Remerciements

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

*En premier lieu, je souhaite remercier le **Dr. Philippe Gual** et le **Dr. Bernard Verrier** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit. Je remercie également le **Pr. Chantal Housset** et le **Dr. Régis Tournebize** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs.*

*Je tiens également à remercier le **Pr. Daniel Scherman** et le **Dr. Nathalie Mignet** de m'avoir accueillie au sein de l'Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS).*

*Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse **Virginie Escriou** de m'avoir permis de réaliser ce projet, pour ses qualités pédagogiques et scientifiques. Je te suis grandement reconnaissante de tout ce que tu m'as apporté et de ta grande compétence dont tu m'as fait bénéficier. Tu m'as formée, tu m'as appris à développer un esprit synthétique et à acquérir de nouvelles méthodologies de travail. Je te promets de m'arrêter quand il le faut et de prendre dorénavant des pauses afin d'être plus efficace et plus productive.*

*Ma reconnaissance toute particulière à ma co-encadrante de thèse, **Céline Hoffmann**, pour sa confiance et pour l'opportunité, qu'elle m'a offerte, de participer à son projet de recherche. J'ai énormément appris auprès de toi tant scientifiquement qu'humainement, merci pour le savoir que tu m'as transmis, pour ton écoute et tes conseils avisés qui ont été indispensables à la réussite de cette thèse, et pour tes encouragements depuis le concours de l'école doctorale. Je ne sais pas comment te dire merci pour ta présence dans les épreuves que j'ai traversées, tu m'as soutenue, encouragée et tu as été là pour moi dans les moments les plus difficiles...*

Merci à toutes les deux pour le temps que vous m'avez accordé tout au long de ces trois années, nos nombreuses réunions dès les premières semaines de ma thèse, malgré vos obligations respectives, ma thèse a toujours été une priorité. Merci également pour nos longues discussions sur Slack durant le confinement qui m'ont été très utiles pour la rédaction de mon manuscrit. Merci pour votre pédagogie pour la relecture attentive et la correction de ce manuscrit.

*Je tiens également à remercier **Anne-Marie Lachagès** pour les techniques qu'elle m'a appris à réaliser durant ma thèse (Western Blot, préparation des liposomes, des plasmides...). Je te remercie pour ton aide précieuse pour la validation des séquences de siRNA in vitro après les nombreux problèmes techniques que j'ai rencontrés. C'est grâce à ton idée d'utiliser le plasmide Col-myc, que cette partie a pu être réalisée. Merci également pour ta patience à répondre à mes nombreuses questions durant cette thèse, ta bonne humeur quotidienne, ta sympathie ainsi que les bons moments passés dans le bureau.*

*Je désire en outre remercier **Pascal Bigey** pour son aide précieuse pour toutes les expérimentations animales (les injections des souris, le prélèvement du sang...) et pour la réalisation des dosages par HPLC. Merci pour tes nombreux conseils, pour ta disponibilité et la gentillesse dont tu as fait preuve. Malgré ton emploi du temps chargé, tu as toujours trouvé un moment pour mes petites souris. Merci également pour ton humour et tes blagues (que j'arrive enfin à saisir, après trois ans de thèse).*

Virginie, Céline, Pascal et Anne-Marie, vous étiez ma deuxième famille. Merci pour m'avoir épaulée, soutenue et encouragée. Je n'oublierai jamais les années que j'ai passées avec vous. Vous avez rendu cette aventure exceptionnelle.

Je remercie également **Rita** qui n'a pas hésité à me donner des conseils très utiles pour la rédaction de mon manuscrit (l'utilisation de Zotero, la mise en page...). Merci pour ta disponibilité, ton soutien dans les derniers moments de ma thèse ainsi que nos discussions quotidiennes dans le RER B.

J'adresse mes remerciements à tous les autres membres de l'équipe Biothérapie : **Dr. Christine Charrueau, Dr. Bernard Hainque et Dr. Dominique Bonnefont-Rousselot** pour leurs conseils précieux et leurs discussions enrichissantes suite à mes différentes présentations en réunion d'équipe. Merci également au **Dr. Angelita Rebollo** pour sa bonne humeur quotidienne, et à **Bertrand et Hélène** pour nos nombreuses discussions lors des pauses déjeuner.

La réalisation de toute l'analyse par microscopie multi-photonique n'aurait pas été possible sans l'aide des **Dr. Julien Fernandes et Anne Danckaert** à l'institut Pasteur. Merci à **Anne** pour le développement de la macro pour quantifier les signaux RF et SHG. Un grand merci à **Julien** pour le temps énorme consacré pour scanner les lames histologiques et pour avoir pris le temps de m'expliquer le principe de la microscopie multi-photonique.

Je remercie le **Dr. Fabienne Foufelle**, de nous avoir fourni des échantillons murins. Merci aux **Pr. Vlad Ratziu, Pr. Isabelle Brocheriou, Pr. Karine Clément et Dr. Judith Aron-Wisnewsky** de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière pour avoir accepté de nous fournir les biopsies humaines que nous avons utilisées pour étudier l'hypertrophie des HSCs et au service d'anatomopathologie pour la réalisation des coupes. Merci au **Dr. Frédéric Charlotte** pour le temps consacré à l'évaluation des lames histologiques et à l'identification du nouveau score d'hypertrophie.

J'adresse mes remerciements à **Virginie Mignon** pour son aide pour la réalisation des expériences de perfusion des souris, pour l'inclusion des échantillons de foie en paraffine, pour m'avoir appris à réaliser des coupes hépatiques ainsi que pour ses conseils précieux pour les expériences d'immunohistochimie. Je remercie également le **Dr. Bruno Saubamea et René Lai-Kuen** qui m'ont accueillie plusieurs fois à la plateforme d'imagerie pour l'utilisation du microtome, du vibratome, du microscope confocal et optique.

Je remercie également toute l'équipe de l'animalerie centrale de la faculté de Pharmacie : **Ihari, Servane, Caroline, Ibtissem, Vanessa** et tous les autres membres de l'équipe. Merci d'avoir pris soin de mes petites souris.

Merci au stagiaire que j'ai encadré durant ma thèse, **Fahed Guedria** pour son excellent travail et son implication dans le projet. Merci à mes anciennes collègues brésiliennes **Danielle, Marcela, Nayara et Bianca** avec qui j'ai partagé d'agréables moments, merci pour nos pauses déjeuner au Crous. Merci à **Bianca** pour les 18 mois que nous avons passés ensemble, pour nos passages quotidiens à l'animalerie et surtout pour nos fous rires. Merci à **Ottavia et Isabelle** avec qui j'ai eu la chance de travailler. Cette aventure n'aurait jamais été la même sans vous les filles.

Un grand merci à **Alfucène** pour sa bonne humeur, sa gentillesse et sa disponibilité. Merci aussi à **Lisa** pour la bonne ambiance au sein du laboratoire et à **Ségar, Evelyne et Emilie** pour leur disponibilité et la gentillesse dont ils ont fait preuve.

Je remercie également tous les autres membres de l'unité **Cyril, Caroline, Yohann, Corinne, Khair, Johanne, Thomas, Shayan, Asad**. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous. Merci à nos

futurs docteurs : **Doan, Louise, Jianhua, Sarah et Panpan**. Je vous souhaite bonne continuation pour la suite. Merci à toutes les personnes que j'ai probablement oubliées.

Merci à **mes parents (Fatiha et Nadjib)** sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui. Malgré les 2590 km qui nous séparent, vous avez toujours été présents pour moi, vous m'avez écoutée, soutenue et encouragée durant toutes ces années. Merci pour les sacrifices que vous avez faits afin que je réalise mes rêves. Vous êtes mes repères. Merci à mes deux sœurs (**Wafa et Safa**) et mon beau-frère **Oussama** d'avoir cru en moi, de votre soutien immense, sans oublier mon petit frère **Yassine** que j'aime très fort.

A mon **grand-père**, Rebbi yerrahmou, j'aurai aimé que tu sois présent avec moi et que tu vois ta petite fille enfin « Docteur », je sais que tu aurais été très fier. Reposes en paix Djeddi. Merci à mes **grand-mères** que j'espère garder auprès de moi le plus longtemps possible ! Merci **Yema** pour tes da3wat et ta joie de vivre que tu nous transmets à chaque communication sur Viber.

Merci à mes beaux-parents (**Hafida et Amor**) pour leur soutien et leurs encouragements, à mon beau-frère **Hicham** et mes belles-sœurs (**Imene, Farah et Dina**) pour nos longues discussions quotidiennes sur Whats'app. Vous n'imaginez pas à quel point ça me remontait le moral.

Merci à **Kamel et Sihem**. Merci pour vos nombreuses visites, pour nos sorties qui me permettaient de penser à autre chose et « d'oublier un peu la thèse » et pour les multiples déménagements. D'ailleurs, maintenant que j'ai fini de rédiger ma thèse, si vous voulez déménager n'hésitez pas :p

Merci à tous mes **oncles et tantes**. Merci à mon deuxième papa **Abderrahman** qui a cru en moi depuis que j'étais toute petite. Ta deuxième fille l'a fait (jebtha 3amou). Merci à **Aissa, Youcef et Moufida**, j'espère que vous êtes fiers de votre nièce ! Merci à **Djanet et Saida** pour leur amour et leurs nombreux coups de fils pour m'encourager, je vous ai toujours considérées comme mes copines et non comme mes tantes. Merci à **Zakia, Leila et Tahar** qui m'ont accueillie chez eux quand je suis arrivée en France, il y a 9 ans déjà ! Un merci spécial à **Djamila**, pour ses encouragements même avant cette thèse (Rebbi yechafik khalti).

Merci à tous mes **cousins et cousines** pour ces beaux moments passés ensemble. Même s'ils sont de plus en plus rares mais toujours pleins de beaux souvenirs. A tous mes **amis** ! A toi **Mélissa**, pour les bons moments passés ensemble en licence et pour ton amitié qui dure malgré la distance.

Et enfin, merci à l'homme de ma vie, **Amine**. Merci pour ta patience et ta présence durant ces trois dernières années, pour ton soutien ininterrompu, pour m'avoir réconfortée, chouchoutée et supportée surtout en cette période de fin de thèse. Merci pour m'avoir nourrie avec des bons plats pour me permettre d'avoir plus de temps pour rédiger. Merci pour notre complicité, nos fous rires et nos sorties thérapeutiques (☺). Je ne te remercierai jamais assez mon cœur. Nhabek

Table des matières

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIERES	11
LISTE DES FIGURES.....	19
LISTE DES TABLEAUX	23
LISTE DES ABREVIATIONS	24
INTRODUCTION.....	30
CHAPITRE I : FOIE ET FIBROSE	31
1. <i>Le foie</i>	31
1.1 Généralités	31
1.2 Fonctions	31
1.2.1 Le métabolisme des glucides.....	31
1.2.2 Le métabolisme des lipides	32
1.2.3 Le métabolisme des protéines.....	32
1.2.4 La production de la bile	32
1.2.5 La détoxification	32
1.2.6 La régénération	33
1.3 Organisation du foie.....	33
1.4 Les cellules hépatiques.....	34
1.4.1 Les hépatocytes	34
1.4.2 Les cellules endothéliales sinusoïdales.....	34
1.4.3 Les cellules de Kupffer	35
1.4.4 Les cellules stellaires	35
1.5 La matrice extracellulaire	35
1.5.1 Le collagène.....	37
1.5.2 Les autres composants de la MEC	38
1.5.2.1 La fibronectine	38
1.5.2.2 La laminine	39
1.5.2.3 Les protéoglycanes.....	40
2. <i>Maladies hépatiques métaboliques</i>	41
2.1 Maladies non alcooliques du foie.....	41
2.2 Fibrose hépatique.....	42
2.3 Epidémiologie.....	43
2.4 Evaluation clinique de la fibrose hépatique	45
2.4.1 Technique invasive : La biopsie hépatique	45
2.4.1.1 Technique.....	45
2.4.1.2 Limites	46
2.4.2 Techniques non invasives	47

2.4.2.1	Dosages sanguins	47
2.4.2.2	Elastographie.....	48
2.5	Physiopathologie de la NASH	49
2.5.1	La stéatose hépatique	49
2.5.2	La stéato-hépatite ou NASH	51
2.5.3	La fibrose hépatique.....	53
3.	<i>Les cellules stellaires hépatiques</i>	56
3.1	Rôles des cellules stellaires dans un foie sain	56
3.1.1	Le stockage de la vitamine A	56
3.1.2	Le remodelage de la MEC.....	56
3.1.3	Le développement et la régénération du foie	57
3.1.4	L'immuno-régulation.....	57
3.2	L'activation des HSCs au cours de la fibrose hépatique	57
3.2.1	Phase d'initiation.....	57
3.2.2	Phase de perpétuation	58
3.2.3	Phase de résolution.....	59
3.2.4	Mécanismes impliqués dans l'activation des HSCs.....	59
3.2.4.1	Les cytokines inflammatoires	59
3.2.4.2	Les chimiokines	61
3.2.4.3	Les interactions immunitaires	61
3.2.4.4	Les régulations épigénétiques.....	62
3.2.4.5	Les récepteurs nucléaires.....	62
3.2.4.6	Les voies neuroendocrines	63
3.2.5	Remodelage de la MEC.....	63
3.3	Les différents marqueurs des HSCs	65
3.3.1	La desmine.....	65
3.3.2	La GFAP.....	65
3.3.3	Le cRBP1	65
3.3.4	La synaptophysine	65
3.3.5	Le récepteur à l'IGF-IIR (<i>insulin-like growth factor</i>).....	66
3.3.6	Le α -SMA (α -Smooth Muscle Actin)	66
3.4	Les rétinoïdes	66
3.4.1	Mise en réserve et mobilisation du rétinol.....	66
3.4.2	Utilisation du rétinol comme marqueur des HSCs.....	68
4.	<i>Modèles de fibrose</i>	70
4.1	Modèles <i>in vivo</i> de fibrose hépatique	70
4.1.1	Modèles chirurgicaux	70
4.1.2	Modèles chimiques.....	70
4.1.2.1	Tétrachlorure de carbone (CCl ₄).....	70
4.1.2.2	Ethanol	71
4.1.2.3	Thioacétamide.....	71
4.1.2.4	DMN et DEN	71

4.1.3	Modèles génétiques	72
4.1.4	Modèles métaboliques	72
4.1.4.1	Methionine Choline Deficient (MCD)	72
4.1.4.2	High-Fat Diet (HFD)	73
4.1.4.3	High Fat High Carbohydrate (HFHC)	74
4.1.4.4	Choline-Deficient L-amino acid-defined High-Fat Diet (CDAHFD)	74
4.2	Modèles <i>in vitro</i> de fibrose hépatique	77
4.2.1	HSCs primaires	77
4.2.2	Lignées cellulaires	79
4.2.2.1	HSC-T6	79
4.2.2.2	Lignée humaine LX-2	80
4.2.2.3	GRX	80
CHAPITRE II : LES APPROCHES THERAPEUTIQUES POUR LA FIBROSE HEPATIQUE		82
1.	<i>La réversibilité de la fibrose</i>	82
1.1	Fibrose due aux Hépatites virales	82
1.2	Fibrose induite par l'alcool	83
1.3	Fibrose induite par la NASH	84
2.	<i>Stratégies thérapeutiques basées sur les mécanismes de la fibrogénèse hépatique</i>	85
2.1	Inhibition de l'apoptose des hépatocytes	86
2.2	Inhibition de l'inflammation et de la réponse immunitaire	87
2.3	Inhibition de l'activation et de la prolifération des HSCs	89
2.3.1	Stress oxydatif	89
2.3.2	Récepteurs nucléaires	90
2.3.3	Voie Wnt / β -caténine	90
2.3.4	Système endocannabinoïde	90
2.4	Élimination des HSCs activées	91
2.4.1	Induction de l'apoptose ou la sénescence des HSCs	91
2.4.2	Induction de l'inversion phénotypique des HSCs	92
2.4.3	Élimination des myofibroblastes par les cellules immunitaires	93
2.5	Inhibition de la production de la MEC	93
2.6	Induction de la dégradation de la MEC	95
3.	<i>Essais cliniques en cours pour le traitement de la fibrose hépatique</i>	96
3.1	Acide norursodésoxycholique (NorUDCA)	96
3.2	Agonistes de FXR	96
3.3	Agonistes de PPAR	98
3.4	Agents ciblant le métabolisme lipidique	99
3.5	Thérapies antidiabétiques	99
3.6	Traitements ciblant l'inflammation et l'apoptose	100
3.7	Traitements ciblant la fibrose	102
CHAPITRE III : L'ARN INTERFERENCE		109
1.	<i>La découverte de l'ARN interférence</i>	109
2.	<i>Le mécanisme de l'ARN interférence</i>	109

2.1	Les siRNA et les shRNA	110
2.2	Les microARN ou miRNA	111
3.	<i>Applications de l'ARN interférence</i>	113
3.1	Compréhension de la fonction génique	113
3.2	Identification et validation de cibles thérapeutiques	115
3.3	Applications thérapeutiques	115
3.3.1	Cancer.....	116
3.3.2	Maladies virales.....	116
3.3.3	Maladies oculaires.....	117
3.3.4	Maladies métaboliques	117
3.3.5	Maladies héréditaires.....	117
4.	<i>Intérêts et limites à l'utilisation thérapeutique des siRNA</i>	118
4.1	Les avantages des siRNA	118
4.2	Obstacles liés à l'utilisation des siRNA	119
4.2.1	Stabilité dans le sang	120
4.2.2	Stimulation immunitaire.....	120
4.2.3	Barrière vasculaire.....	120
4.2.4	Barrière cellulaire	120
4.2.5	Relargage de l'endosome	121
4.2.6	Effets hors cible	122
4.3	Les stratégies pour surmonter les obstacles	122
4.4	Voies d'administration	124
4.4.1	Voie systémique	124
4.4.2	Voie sous-cutanée	124
4.4.3	Voie loco-régionale.....	125
4.4.4	Voie orale	125
5.	<i>Vectorisation</i>	127
5.1	Les vecteurs viraux	127
5.2	Les vecteurs non viraux	128
5.2.1	La modification chimique des siRNA	129
5.2.2	La bioconjugaison des siRNA	131
5.2.2.1	Conjugaison au cholestérol	132
5.2.2.2	Conjugaison à un dérivé de galactose	132
5.2.2.3	Conjugaison à un PEG.....	134
5.2.2.4	Conjugaison aux aptamères	134
5.2.2.5	Conjugaison aux peptides à pénétration cellulaire (CPP)	135
5.2.3	La vectorisation physique	136
5.2.3.1	Les nanoparticules à base de polymères.....	136
5.2.3.1.1	Les polymères synthétiques	137
5.2.3.1.2	Les polymères naturels.....	139
5.2.3.2	Les nanoparticules lipidiques	141
5.2.3.2.1	Les liposomes	142

5.2.3.2.2	Les lipoplexes.....	143
5.2.3.2.3	Les particules lipidiques d'acide nucléique stables (SNALP)	149
5.2.3.2.4	Les lipidoïdes	150
5.2.3.3	Les lipopolyplexes (LPP)	151
5.2.3.3.1	Les LPP à base de polymère.....	151
5.2.3.3.2	Les LPP à base de peptide.....	151
6.	<i>Les siRNA en essais cliniques et sur le marché</i>	153
6.1	Les essais cliniques utilisant des siRNA	153
6.2	Les siRNA commercialisés	158
6.2.1	Patisiran.....	158
6.2.2	Givosiran.....	160
CHAPITRE IV : LES STRATEGIES THERAPEUTIQUES A BASE D'ARN INTERFERENTS		163
1.	<i>Stratégies pour une administration ciblée des agents thérapeutiques aux HSCs</i>	163
1.1	Récepteur au collagène de type VI.....	164
1.2	Récepteur aux RBPs (RBPR).....	165
1.3	Récepteur à l'Insulin-like Growth Factor II / mannose-6-phosphate (IGF-IIR/M6P).....	166
1.4	Récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes β (PDGFR- β)	167
1.5	Synaptophysine (SYN)	167
1.6	Récepteur à l'AH (Cluster of differentiation CD44)	168
2.	<i>Les approches thérapeutiques à base d'ARN interférents</i>	169
2.1	Collagène et protéines associées	169
2.2	Facteur de croissance transformant β (TGF- β).....	172
2.3	Facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF)	173
2.4	Facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)	174
2.5	MMPs et TIMPs	174
2.6	Autres protéines.....	175
3.	<i>Approche multicellulaire et stratégie combinatoire</i>	177
OBJECTIFS DE THESE		179
RESULTATS		181
CHAPITRE I : DECOUVERTE DE L'ASSOCIATION DE L'HYPERTROPHIE DES CELLULES STELLAIRES AVEC LA FIBROSE HEPATIQUE DANS DES MODELES MURINS ET CHEZ L'HUMAIN		182
1.	<i>Justification du choix du modèle de fibrose hépatique</i>	182
2.	<i>Caractérisation du modèle CDAHFD</i>	183
2.1	Modifications physiologiques chez les souris CDAHFD	184
2.2	Caractérisation histologique du modèle CDAHFD	187
2.3	Etude de l'expression protéique d'un marqueur de fibrose : le α -SMA	191
3.	<i>Mise en évidence d'une hypertrophie cellulaire dans le modèle CDAHFD</i>	192
3.1	Par microscopie optique.....	192
3.2	Par microscopie à fluorescence.....	193
3.3	Analyse spectrale	195

3.4	Quantification des rétinoïdes dans le foie.....	198
3.4.1	Optimisation et mise au point du protocole d'extraction des rétinoïdes.....	198
3.4.2	Dosage des rétinoïdes par HPLC.....	200
4.	<i>Identification des cellules hypertrophiées</i>	203
4.1	Expression des marqueurs spécifiques des HSCs	203
4.1.1	La desmine.....	203
4.1.2	Le cRBP1 (cellular Retinol Binding Protein-1).....	205
4.2	Etude de l'état d'activation et de prolifération des HSCs.....	208
4.2.1	L'actine α du muscle lisse (α -SMA).....	208
4.2.2	Le Ki67	210
5.	<i>Caractérisation de la fibrose et des accumulations de rétinoïdes par microscopie multi-photonique</i> 211	
5.1	Intérêt de la microscopie multi-photonique	212
5.2	Etude spatio-temporelle.....	213
5.2.1	Conception de la méthode	213
5.2.2	Répartition spatiale	214
5.2.3	Répartition temporelle	214
5.2.4	Quantification des signaux de rétinoïdes et des fibres de collagène	215
6.	<i>Mise en évidence de l'hypertrophie des HSCs dans d'autres modèles de maladies hépatiques</i>	217
6.1	Caractérisation de la fibrose sur d'autres modèles murins de maladies hépatiques métaboliques	217
6.1.1	Le modèle déficient en méthionine et en choline (MCD).....	217
6.1.2	Le modèle de type «western diet» (High Fat High Carbohydrate, HFHC).....	219
6.2	Mise en évidence de l'hypertrophie des HSCs par microscopie multi-photonique.....	221
6.2.1	Modèles métaboliques	221
6.2.2	Autres modèles de fibrose hépatique	221
7.	<i>Mise en évidence de l'hypertrophie des HSCs chez l'humain</i>	223
7.1	L'hypertrophie des HSCs dans la fibrose hépatique métabolique humaine	223
7.2	Corrélation entre l'hypertrophie des HSCs et la fibrose.....	226
7.3	Hypertrophie des HSCs dans la fibrose hépatique humaine induite par d'autres étiologies	227
8.	<i>Conclusion</i>	228
CHAPITRE II : STRATEGIE DE VECTORISATION DE SIRNA POUR L'INHIBITION DE L'EXPRESSION DU COLLAGENE DANS LE MODELE		
	CDAHFD	230
1.	<i>Formulation des siRNA</i>	230
1.1	Stratégie de vectorisation des siRNA.....	230
1.2	Caractérisation des différentes formulations de liposome cationique	232
1.2.1	Détermination de la taille des liposomes et des lipoplexes par DLS.....	232
1.2.2	Evaluation de l'efficacité des différentes formulations de lipoplexes <i>in vitro</i>	234
1.3	Etude de la distribution des différentes formulations de lipoplexes dans les cellules hépatiques	236
1.3.1	Analyse de la distribution par cytométrie	236
1.3.2	Analyse de la distribution par microscopie.....	239
1.3.2.1	Caractérisation des cellules hépatiques	239

1.3.2.2	Efficacité d'administration des siRNA dans le tissu hépatique	244
1.3.2.3	Répartition des siRNA dans les cellules hépatiques	247
2.	<i>Etude de l'efficacité d'inhibition des siRNA anti-collagène 1 in vitro</i>	251
2.1	Identification des séquences de siRNA anti-collagène 1	252
2.2	Mise en place d'un modèle d'étude de l'efficacité d'interférence des siRNA	253
2.3	Mise en place d'un modèle <i>in vitro</i> d'activation des HSCs	254
2.3.1	Suivi morphologique des HSCs en culture	255
2.3.2	Caractérisation des HSCs primaires en culture.....	256
2.3.3	Production de collagène par les HSCs primaires	259
3.	<i>Evaluation du potentiel thérapeutique des vecteurs de siRNA anti-collagène dans le modèle CDAHFD</i>	260
4.	<i>Conclusion</i>	262
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		263
MATERIELS ET METHODES		276
1.	<i>Animaux et échantillons humains</i>	277
1.1	Animaux	277
1.2	Échantillons humains.....	277
2.	<i>Expériences sur souris</i>	278
2.1	Traitement des échantillons de foie	278
2.2	Injection de siRNA fluorescents aux souris.....	278
2.3	Fixation <i>in situ</i> par perfusion	279
2.4	Dissociation enzymatique <i>in situ</i> du foie	280
2.5	Purification des cellules stellaires primaires de souris	281
2.6	Injections des siRNA anti-Col1 α 1 aux souris.....	282
3.	<i>Techniques histologiques</i>	282
3.1	Colorations histologiques	282
3.1.1	Coloration à l'Hématoxyline et l'Eosine.....	282
3.1.2	Coloration Sirius Red-Hématoxyline.....	283
3.2	Immunohistochimie sur coupes hépatiques réalisées au microtome	283
3.3	Immunohistochimie sur coupes hépatiques réalisées au vibratome	284
4.	<i>Techniques biochimiques</i>	285
4.1	Dosages sériques	285
4.2	Lysats de foies	285
4.3	Dosage de la quantité de protéines totales.....	286
4.4	Western Blot	286
4.5	Dosage de l'activité de la luciférase	287
4.6	Quantification du dépôt de collagène par les HSCs.....	287
4.7	Extraction et dosage des rétinoides	287
5.	<i>Techniques physico-chimiques</i>	288
5.1	Préparation des liposomes	288

5.2	Préparation des lipoplexes de siRNA.....	289
5.3	Mesure de la taille des liposomes et lipoplexes.....	290
6.	<i>Techniques de biologie cellulaire</i>	290
6.1	Culture cellulaire.....	290
6.2	Immuno-cyto-fluorescence.....	291
6.3	Transfection des cellules B16Luc.....	291
6.4	Validation des séquences de siRNA anti-Col1 α 1.....	292
6.5	Immunomarquage des cellules hépatiques et analyse par cytométrie en flux.....	293
7.	<i>Imagerie</i>	295
7.1	Microscopie optique.....	295
7.2	Microscopie confocale.....	295
7.3	Microscopie de fluorescence.....	295
7.4	Microscopie multi-photonique.....	295
7.5	Analyse spectrale.....	296
8.	<i>Etude statistique</i>	296
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	297
	ANNEXE	331
	ARTICLE : HEPATIC STELLATE CELL HYPERTROPHY IS ASSOCIATED WITH METABOLIC LIVER FIBROSIS.....	331

Liste des figures

FIGURE 1 : ANATOMIE DU FOIE ET SA RELATION MACROSCOPIQUE AVEC LE TRACTUS INTESTINAL ET LE SYSTEME VASCULAIRE.	31
FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ARCHITECTURE DU FOIE ET DU LOBULE HEPATIQUE.	33
FIGURE 3 : SCHEMAS DECRIVANT LA STRUCTURE DU LOBULE HEPATIQUE ET DU SINUSOÏDE.....	35
FIGURE 4 : STRUCTURE ET ASSEMBLAGE DU COLLAGENE FIBRILLAIRE.....	38
FIGURE 5 : STRUCTURE DE LA FIBRONECTINE.....	39
FIGURE 6 : STRUCTURE DE LA LAMININE.	39
FIGURE 7 : REPRESENTATION DE CERTAINS PROTEOGLYCANES ET GAG.	40
FIGURE 8 : LE SPECTRE DE LA MALADIE DE LA STEATO-HEPATITE NON ALCOOLIQUE.	42
FIGURE 9 : DEVELOPPEMENT ET PROGRESSION DE LA FIBROSE HEPATIQUE.....	43
FIGURE 10 : REPRESENTATION DES PRINCIPALES TECHNIQUES D'EVALUATION DE LA FIBROSE HEPATIQUE.	48
FIGURE 11 : METABOLISME DES TRIGLYCERIDES DANS LE FOIE.....	50
FIGURE 12 : LES VOIES DE LIPOTOXICITE DANS LES NAFLD	52
FIGURE 13 : HOMEOSTASIE DE LA MEC.	53
FIGURE 14 : MATRICE ET ALTERATION CELLULAIRE DANS LA FIBROSE HEPATIQUE.....	54
FIGURE 15 : ORIGINE DES MYOFIBROBLASTES AU COURS DE LA FIBROSE HEPATIQUE.	55
FIGURE 16 : PROCESSUS D'ACTIVATION DES CELLULES STELLAIRES HEPATIQUES.....	58
FIGURE 17 : PRINCIPALES VOIES D'ACTIVATION DE HSCs.	60
FIGURE 18 : REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DANS LES HSCs PENDANT LA FIBROSE.	62
FIGURE 19 : LIAISON DE CERTAINS FACTEURS DE CROISSANCE ET CYTOKINES A LA MEC.	64
FIGURE 20 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ABSORPTION, DU TRANSPORT, DU STOCKAGE DE LA VITAMINE A DANS LE FOIE ET DE LA REDISTRIBUTION AUX TISSUS PERIPHERIQUES.	67
FIGURE 21 : ACTIVATION ET TRANSDIFFERENCIATION DES HSCs PRIMAIRES EN CULTURE.....	69
FIGURE 22 : ANALYSE HISTOLOGIQUE DES COUPES DE FOIE DE SOURIS SOUMISES AU REGIME CDAHf.	75
FIGURE 23 : APERÇU SCHEMATIQUE DU PROTOCOLE D'ISOLEMENT DES HSCs MURINES.....	78
FIGURE 24 : APERÇU SCHEMATIQUE DU PROTOCOLE DE PURIFICATION DES HSCs VIA LE TRI CELLULAIRE PAR FLUORESCENCE.....	79
FIGURE 25 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES STRATEGIES THERAPEUTIQUES BASEES SUR LES MECANISMES DE LA FIBROGENESE. ..	86
FIGURE 26 : ROLE DES MACROPHAGES DANS LA PROGRESSION ET LA REGRESSION DE LA FIBROSE HEPATIQUE.	88
FIGURE 27 : LE DEVENIR DES HSCs PENDANT LA PROGRESSION ET LA RESOLUTION DE LA FIBROSE HEPATIQUE.	92
FIGURE 28 : MECANISME PROPOSE POUR L'AUGMENTATION DE LA RIGIDITE DE LA MEC INDUITE PAR LOXL2.	94
FIGURE 29 : STRUCTURE D'UN siRNA ET MODELE SIMPLIFIE DU MECANISME D'ARNi.....	111
FIGURE 30 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES D'ARN INTERFERENCE.....	112
FIGURE 31 : INHIBITION GENIQUE <i>IN VIVO</i> CHEZ LES MAMMIFERES.....	114
FIGURE 32 : UTILISATION DE L'ARNi POUR L'IDENTIFICATION ET LA VALIDATION DE CIBLES THERAPEUTIQUES.	115
FIGURE 33 : OBSTACLES LIES A L'UTILISATION THERAPEUTIQUE DE siRNA.	119

FIGURE 34 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE QUELQUES STRATEGIES COMMUNES POUR SURMONTER LES OBSTACLES LIES A L'ADMINISTRATION SYSTEMIQUE ET NON VIRALE DE siRNA.	122
FIGURE 35 : STRUCTURE D'UN ARN.	129
FIGURE 36 : MODIFICATIONS CHIMIQUES COURANTES DU SQUELETTE DE siRNA.	129
FIGURE 37 : EXEMPLES DE BIOCONJUGAISON DES siRNA. ESPACEUR AU LIEU DE LINKEUR, APTAMERE,	131
FIGURE 38 : ADMINISTRATION DE siRNA AUX HEPATOCYTES MEDIEE PAR GALNAC / ASGPR.	133
FIGURE 39 : CONJUGUE GALNAC-siRNA.	134
FIGURE 40 : SCHEMA DES SYSTEMES D'ADMINISTRATION POLYMERIQUES DE siRNA.	141
FIGURE 41 : STRUCTURE D'UN LIPOSOME.	142
FIGURE 42 : STRUCTURE MULTILAMELLAIRE DES LIPOPLEXES A BASE DE LIPIDES CATIONIQUES ET D'ACIDE NUCLEIQUE.	143
FIGURE 43 : STRUCTURES DES DIFFERENTS LIPIDES UTILISES POUR LA TRANSFECTION D'ACIDES NUCLEIQUES.	144
FIGURE 44 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FORMATION DE LIPOPLEXES A BASE DE LIPOSOME CATIONIQUE ET DE POLYMERE ANIONIQUE.	146
FIGURE 45 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES POLYMERES ANIONIQUES AJOUTES DANS LES LIPOPLEXES DE siRNA.	147
FIGURE 46 : STRUCTURE DE LIPOPLEXES DE siRNA AVEC OU SANS ADJUVANT AJOUTE, IMAGES PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION.	148
FIGURE 47 : LE NOMBRE D'ESSAIS CLINIQUES A BASE DE siRNA PAR PHASE, LANCES ENTRE 2004-2020.	153
FIGURE 48 : ORGANES CIBLES DES TROIS PRINCIPAUX SYSTEMES D'ADMINISTRATION DES siRNA THERAPEUTIQUES, PAR POURCENTAGE D'ESSAIS CLINIQUES AU COURS DE LA PERIODE 2004-2020.	154
FIGURE 49 : SYSTEMES D'ADMINISTRATION DE siRNA DANS LES ESSAIS CLINIQUES.	155
FIGURE 50 : LE MECANISME THERAPEUTIQUE DU PATISIRAN.	158
FIGURE 51 : MODELE DE DISTRIBUTION MEDIEE PAR DES NPL DE siRNA AUX HEPATOCYTES <i>IN VIVO</i> , UTILISE POUR L'ADMINISTRATION DE PATISIRAN.	159
FIGURE 52 : STRUCTURE CHIMIQUE DU GIVOSIRAN (GIVLAARI).	161
FIGURE 53 : SYSTEME D'ADMINISTRATION DE siRNA ACTUELLEMENT APPROUVES.	161
FIGURE 54 : RECEPTEURS SUREXPRIMES DANS LES HSCs ACTIVEES.	163
FIGURE 55 : UN MODELE SCHEMATIQUE D'UNE BOUCLE DE REGULATION POSITIVE ENTRE TGF- β 1 / SMAD ET TRPM7.	173
FIGURE 56 : ÉVOLUTION TEMPORELLE DU POIDS CORPOREL ET DU POIDS DU FOIE DES SOURIS CDAHFD OU SD.	184
FIGURE 57 : ASPECT MACROSCOPIQUE DU FOIE DES SOURIS SD ET CDAHFD APRES 12 ET 35 SEMAINES DE REGIME.	184
FIGURE 58 : EVALUATION HISTOLOGIQUE DE LA STEATOSE SUR LE MODELE CDAHFD.	187
FIGURE 59 : EVALUATION HISTOLOGIQUE DE L'INFLAMMATION SUR LE MODELE CDAHFD.	188
FIGURE 60 : EVALUATION HISTOLOGIQUE DE LA BALLONISATION HEPATOCELLULAIRE SUR LE MODELE CDAHFD.	189
FIGURE 61 : EVALUATION HISTOLOGIQUE DE LA FIBROSE HEPATIQUE SUR LE MODELE CDAHFD.	190
FIGURE 62 : ANALYSE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE DU MARQUEUR DE FIBROSE α -SMA.	191
FIGURE 63 : MISE EN EVIDENCE D'UNE HYPERTROPHIE CELLULAIRE.	193
FIGURE 64 : VISUALISATION DU SIGNAL DE FLUORESCENCE DANS LES ZONES D'HYPERTROPHIE PAR MICROSCOPIE A FLUORESCENCE.	194
FIGURE 65 : IMAGES MICROSCOPIQUES DES HSCs PRIMAIRES ISOLEES D'UN FOIE DE SOURIS SD.	195

FIGURE 66 : ANALYSE SPECTRALE DES GOUTTELETTES FLUORESCENTES DE RETINOÏDES DANS DES HSCS PRIMAIRES ET SUR DES COUPES DE FOIE DES SOURIS CDAHFD.	196
FIGURE 67 : SPECTRES D'ÉMISSION DE FLUORESCENCE NORMALISES DES GOUTTELETTES DE RETINOÏDES.	197
FIGURE 68 : SCHEMA DECRIVANT LE PROTOCOLE OPTIMISE D'EXTRACTION DES RETINOÏDES A PARTIR D'UN LYSAT DE FOIE.....	199
FIGURE 69 : EXEMPLE D'UN CHROMATOGRAMME HPLC/UV OBTENU SUR UN MELANGE DE RETINOÏDES.	200
FIGURE 70 : QUANTIFICATION DES RETINOÏDES DANS LE FOIE DE SOURIS CDAHFD ET SD PAR HPLC.	201
FIGURE 71 : OBSERVATION DES GOUTTELETTES DE RETINOÏDES FLUORESCENTES AU NIVEAU PERI-SINUSOÏDAL SUR LES COUPES DE FOIE DE SOURIS SD.	202
FIGURE 72 : EXPRESSION DE LA DESMINE PAR LES HSCS DANS LES ZONES D'HYPERTROPHIE.	204
FIGURE 73 : CINETIQUE DE L'EXPRESSION DE LA DESMINE SUR DES COUPES DE FOIE DE SOURIS CDAHFD APRES 3, 6, 9 ET 12 SEMAINES DE REGIME.	205
FIGURE 74 : EXPRESSION DU cRBP1 PAR LES HSCS DANS LES ZONES D'HYPERTROPHIE.	206
FIGURE 75 : CINETIQUE DE L'EXPRESSION DU cRBP1 SUR DES COUPES HEPATIQUES DE SOURIS CDAHFD APRES 3, 6, 9 ET 12 SEMAINES DE REGIME.	207
FIGURE 76 : EXPRESSION DU A-SMA PAR LES HSCS DANS LES ZONES D'HYPERTROPHIE.	208
FIGURE 77 : CINETIQUE DE L'EXPRESSION DU A-SMA SUR DES COUPES DE FOIE DE SOURIS CDAHFD APRES 3, 6, 9 ET 12 SEMAINES DE REGIME.	209
FIGURE 78 : COLOCALISATION DU A-SMA ET DES GOUTTELETTES DE RETINOÏDES DANS UNE CELLULE STELLAIRE HYPERTROPHIEE SUR UNE COUPE DE FOIE DE SOURIS CDAHFD.	210
FIGURE 79 : ETAT DE PROLIFERATION DES CELLULES DANS LES ZONES D'HYPERTROPHIE.	210
FIGURE 80 : MARQUEURS DE CELLULES STELLAIRES SELON LEUR ETAT D'ACTIVATION.	211
FIGURE 81 : COLOCALISATION DES GOUTTELETTES DE RETINOÏDES ET DES FIBRES DE COLLAGENE SUR LES COUPES DE FOIE DE SOURIS CDAHFD.	212
FIGURE 82 : METHODE D'ANALYSE DES COUPES DE FOIE DE SOURIS CDAHFD PAR MICROSCOPIE MULTI-PHOTONIQUE.	213
FIGURE 83 : ANALYSE DE LA REPARTITION SPATIALE DU SIGNAL CF/SHG ET DU SIGNAL RF SUR UNE COUPE DE FOIE DE SOURIS CDAHFD PAR MICROSCOPIE MULTI-PHOTONIQUE.	214
FIGURE 84 : CINETIQUE DU COLLAGENE ET DES RETINOÏDES SUR LES COUPES DE FOIE DES SOURIS CDAHFD.....	215
FIGURE 85 : QUANTIFICATION DU SIGNAL DE FLUORESCENCE DES RETINOÏDES (RF) ET DES FIBRES DE COLLAGENE (CF / SHG).....	216
FIGURE 86 : SUIVI DU POIDS CORPOREL DES SOURIS MCD ET SD EN FONCTION DU TEMPS.	217
FIGURE 87 : ANALYSE HISTOLOGIQUE ET MISE EN EVIDENCE DE L'HYPERTROPHIE DES HSCS DANS LE MODELE MCD.	218
FIGURE 88 : SUIVI DU POIDS CORPOREL MOYEN DE SOURIS SD ET HFHC EN FONCTION DU TEMPS.	219
FIGURE 89 : ANALYSE HISTOLOGIQUE DU MODELE HFHC.	220
FIGURE 90 : CORRELATION ENTRE LA FIBROSE ET L'HYPERTROPHIE DANS LES MODELES DE MALADIES HEPATIQUES METABOLIQUES (MCD, HFHC ET CDAHFD).....	220
FIGURE 91 : ANALYSE PAR MICROSCOPIE MULTI-PHOTONIQUE DES COUPES DE FOIE DE SOURIS, CDAHFD, MCD ET HFHC.	221
FIGURE 92 : ANALYSE PAR MICROSCOPIE MULTI-PHOTONIQUE DES COUPES DE FOIE DE SOURIS DES MODELES CDAHFD, CCL4 ET BDL.	222
FIGURE 93 : MISE EN EVIDENCE DES ACCUMULATIONS DE GOUTTELETTES DE RETINOÏDES DANS LA FIBROSE HEPATIQUE HUMAINE. .	224

FIGURE 94 : COLOCALISATION DES GOUTTELETTES DE RETINOÏDES ET DES FIBRES DE COLLAGENE SUR LES BIOPSIES HEPATIQUES HUMAINES.	225
FIGURE 95 : CORRELATION ENTRE L’HYPERTROPHIE DES HSCs ET LA FIBROSE HEPATIQUE HUMAINE.	226
FIGURE 96 : PRESENCE DE HSCs HYPERTROPHIEES DANS LA FIBROSE HEPATIQUE HUMAINE.	227
FIGURE 97 : STRUCTURE DES DIFFERENTS LIPIDES UTILISES POUR LA PREPARATION DES LIPOSOMES.....	232
FIGURE 98 : ACTIVITE D’EXTINCTION DE LA LUCIFERASE DES DIFFERENTES FORMULATIONS SUR LES CELLULES B16LUC.....	235
FIGURE 99 : QUANTIFICATION DES CELLULES HEPATIQUES PRESENTANT UN SIGNAL FLUORESCENT DU siRNA APRES INJECTION IV DES DIFFERENTES FORMULATIONS DE LIPOPLEXES.....	236
FIGURE 100 : DETERMINATION DES TYPES CELLULAIRES AYANT INTERNALISE LES siRNA FLUORESCENTS APRES INJECTION IV DES LIPOPLEXES.....	237
FIGURE 101 : VISUALISATION DE LA STRUCTURE D’UN FOIE SAIN DE SOURIS SD ET D’UN FOIE FIBROTIQUE DE SOURIS CDAHFD. ...	240
FIGURE 102: VISUALISATION DES CELLULES ENDOTHELIALES SUR DES COUPES DE FOIE DE SOURIS SD ET CDAHFD.....	241
FIGURE 103 : VISUALISATION DES CELLULES STELLAIRES HEPATIQUES SUR DES COUPES DE FOIE DE SOURIS SD ET CDAHFD.	242
FIGURE 104 : VISUALISATION DES CELLULES DE KUPFFER SUR DES COUPES DE FOIE DE SOURIS SD ET CDAHFD.	243
FIGURE 105 : ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES siRNA FLUORESCENTS DANS LE FOIE DES SOURIS SD APRES UNE INJECTION IV DES DIFFERENTES FORMULATIONS.....	245
FIGURE 106 : ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES siRNA FLUORESCENTS DANS LE FOIE DES SOURIS CDAHFD APRES UNE INJECTION IV DES DIFFERENTES FORMULATIONS.....	246
FIGURE 107 : ETUDE DE LA REPARTITION DES LIPOPLEXES DANS LES CELLULES DE KUPFFER.	248
FIGURE 108 : ETUDE DE LA REPARTITION DES LIPOPLEXES DANS LES CELLULES STELLAIRES.....	250
FIGURE 109 : POSITION DES SIX SEQUENCES DE siRNA TESTEES SUR L’ARNM DU COLLAGENE 1A1 DE SOURIS.	252
FIGURE 110 : MODELE CELLULAIRE DE VALIDATION DES SEQUENCES DE siRNA.	253
FIGURE 111 : VALIDATION DES SEQUENCES DE siRNA DIRIGES CONTRE COL1A1.....	254
FIGURE 112 : SUIVI MORPHOLOGIQUE DES CELLULES STELLAIRES HEPATIQUES.....	255
FIGURE 113 : CARACTERISATION PAR IMMUNOFLUORESCENCE DE L’EXPRESSION DE LA DESMINE PAR LES HSCs PRIMAIRES DE SOURIS EN CULTURE.	256
FIGURE 114 : CARACTERISATION PAR IMMUNOFLUORESCENCE DE L’EXPRESSION DU CRBP1 PAR LES HSCs PRIMAIRES DE SOURIS EN CULTURE.....	257
FIGURE 115 : EXPRESSION DU a-SMA PAR LES HSCs PRIMAIRES APRES 7 JOURS DE MISE EN CULTURE.....	258
FIGURE 116 : PRODUCTION DE COLLAGENE PAR LES HSCs PRIMAIRES DE SOURIS.....	259
FIGURE 117 : PROTOCOLE EXPERIMENTAL POUR L’EVALUATION DE L’EFFICACITE THERAPEUTIQUE DES VECTEURS DE siCOL DANS LE MODELE CDAHFD.	261
FIGURE 118 : PRESENCE DE HSCs HYPERTROPHIEES DANS DIFFERENTS MODELES DE FIBROSE CHEZ LA SOURIS.	266
FIGURE 119 : ETUDE DE LA LOCALISATION PAR IMMUNOFLUORESCENCE SUR COUPES DE FOIE.	279
FIGURE 120 : IMAGES DE FOIE AVANT ET APRES PERFUSION.....	280
FIGURE 121 : ETUDE DE LA DISTRIBUTION HEPATIQUE DES siRNA PAR CYTOMETRIE EN FLUX.	281
FIGURE 122 : ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES CELLULES HEPATIQUES DE SOURIS INJECTEES AVEC LES siRNA FLUORESCENTS.	294

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : SCORE DE NAS ET FIBROSE	46
TABLEAU 2 : LES PRINCIPAUX MODELES <i>IN VIVO</i> DE FIBROSE HEPATIQUE.	76
TABLEAU 3 : LES PRINCIPAUX MODELES <i>IN VITRO</i> DE FIBROSE HEPATIQUE.	81
TABLEAU 4 : EXEMPLES D'ESSAIS CLINIQUES POUR LE TRAITEMENT DE LA FIBROSE HEPATIQUE.	107
TABLEAU 5 : LES STRATEGIES THERAPEUTIQUES POUR SURMONTER LES OBSTACLES LIES A L'UTILISATION DES siRNA.	123
TABLEAU 6 : COMPARAISON DES PRINCIPAUX VECTEURS VIRAUX UTILISES POUR L'ADMINISTRATION DE siRNA.	127
TABLEAU 7 : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES VECTEURS VIRAUX ET NON VIRAUX POUR L'ADMINISTRATION DE siRNA.	128
TABLEAU 8 : EXEMPLES DE MODIFICATIONS CHIMIQUES DE siRNA.....	130
TABLEAU 9 : LES PRINCIPAUX ESSAIS CLINIQUES EN COURS DE CANDIDATS-MEDICAMENTS A BASE DE siRNA.	157
TABLEAU 10 : MARQUEURS SPECIFIQUES DES HSCS POUR UNE ADMINISTRATION CIBLEE D'AGENTS ANTI-FIBROTIQUES.	164
TABLEAU 11 : ÉVOLUTION TEMPORELLE DES BIOMARQUEURS SANGUINS CHEZ LES SOURIS CDAHFD.....	186
TABLEAU 12 : CARACTERISTIQUES DES PATIENTS INCLUS DANS L'ÉTUDE.	224
TABLEAU 13 : DIFFERENTES FORMULATIONS DE LIPOSOMES TESTES.	233
TABLEAU 14 : DETERMINATION DE LA TAILLE DES LIPOSOMES ET DES LIPOPLEXES DE siRNA.....	233
TABLEAU 15 : QUANTIFICATION DE L'ADMINISTRATION DES siRNA DANS LE TISSU HEPATIQUE.....	247
TABLEAU 16 : NOMBRE DE SOURIS INJECTEES PAR CHAQUE FORMULATION DE LIPOPLEXES DE siRNA.	279
TABLEAU 17 : ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES POUR LE MARQUAGE DES COUPES AU MICROTOME.	284
TABLEAU 18 : ANTICORPS UTILISES POUR LES EXPERIENCES D'IHC SUR LES COUPES AU VIBRATOME.	285
TABLEAU 19 : LISTE DES LIPIDES UTILISES POUR LA PREPARATION DES LIPOSOMES.	288
TABLEAU 20 : QUANTITES DE LIPIDES NECESSAIRES POUR LA PREPARATION DES DIFFERENTES FORMULATIONS LIPOSOMALES.	289
TABLEAU 21 : SEQUENCES DES DIFFERENTS siRNA UTILISES POUR LA TRANSFECTION DES CELLULES ET LES INJECTIONS DES SOURIS.	290
TABLEAU 22 : ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES UTILISES POUR L'IMMUNOMARQUAGE DES CELLULES HEPATIQUES.....	293

Liste des abréviations

αCP2	α-complex protein 2
α-SMA	Alpha smooth muscle actin
AAD	Antiviraux à action directe
AAV	Vecteurs adéno-associés
ABCB4	ATP-binding cassette 4 gene
ACN	Acétonitrile
Adipor1	Récepteur de l'adiponectine 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ago-2	Argonaute-2
aHSC	Activated hepatic stellate cell
ALAT	Alanine aminotransférase
ALD	Alcoholic liver disease / Maladies hépatiques alcooliques
Apo	Apolipoprotéine
APRI	Indice du rapport AST/plaquettes
ARNdb	Acide ribonucléique double brin
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messenger
ASAT	Aspartate aminotransférase
ASGPR	Asialo-glycoprotéine
ASK1	Kinase régulatrice du signal d'apoptose 1
AV	Adénovirus
Bax	<i>Bcl-2 associated X</i>
BBP	Bleu de bromophénol
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCR – ABL	<i>Breakpoint Cluster Region - Abelson</i>
BDL	<i>Bile duct ligation</i>
BID	<i>BH3 interacting-domain</i>
BiPPB	<i>PDGFβR-specific bicyclic peptide</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCl₄	Tétrachlorure de carbone
CCR2	Chemokine receptor
CD44	Cluster of differentiation
CDA	Choline-deficient L-amino acid-defined
CDAHFD	Choline-Deficient L-amino acid-defined High-Fat Diet
CDP	Cyclodextrin polymer
CF	Collagen fiber
CHC	Carcinome Hépatocellulaire

Chol	Cholestérol
ChREBP	Carbohydrate response element binding protein
CLD	Chronic liver disease
Col	Collgène
CPP	Cell-penetrating peptide
cRBP1	cellular retinol binding protein-1
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
CTGF	Connective tissue growth factor
CXCL	Chemokine (CXC motif) ligand
CXCR	Chemokine receptor
CYP	Cytochrome P
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
Dbp	D-Box Binding PAR BZIP Transcription Factor
DC-Chol	3 β -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle]cholestérol
DEN	Diéthylnitrosamine
DLin-DMA	1,2-dilinoléyloxy-3-diméthylaminopropane
DLS	Dynamic light scattering
DMAPAP	Di-Miristyl AminoPropyl AminoPropyl
DMEM	Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium
DMN	Diméthylnitrosamine
DODA	dioctadecyldiméthylammonium chloride
DOGS	Dioctadecylamidoglycylspermine
DOPE	1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine
DOSPER	1,3-di-oléoyloxy-2-(6-carboxy-spermyl)-propylamid
DOTAP	Dioléyltriméthylammoniumpropane
DOTMA	1,2-di-O-octadecenyl-3-triméthylammonium propane
DOX	Doxorubicine
DSPC	1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EMA	European Medicines Agency
EphA2	EPH récepteur A2
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fas	Fas Cell Surface Death Récepteur
FDA	Food and Drug Administration
FFA	Free fatty acids
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FXR	Farnésoid X récepteur
GAG	Glycosaminoglycanes

GaINAc	N-acétyl-galactosamine
GBSS	Gey's Balanced Salt Solution
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
H&E	Hématoxyline et l'Eosine
HDL	High density lipoprotein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HFD	High fat diet
HFHC	High fat high carbohydrate
HGF	Hepatocyte growth factor
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HSA	Human serum albumin
HSC	Hepatic stellate cell
HSP47	Heat shock protein 47
IFN	Interféron
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGF-IIR	<i>Insulin-like Growth Factor II receptor</i>
IgG	Immunoglobulines de type G
IHC	Immunohistochimie
iHSC	inactivated hepatic stellate cell
IL	Interleukine
IP	Intrapéritonéal
IV	Intraveineuse
KO	Knock Out
LDL	Low density lipoprotein
LOX	Lysyl oxydase
LOXL	Lysyl oxydase-like
LPP	Lipopolyplexe
LPS	Lipopolysaccharides
LRAT	Lecithin-retinol acyltransferase
M6P	Mannose 6 phosphate
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCD	Methionine and choline deficient
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MDR	Multidrug resistance protein
MEC	Matrice extracellulaire
miRNA	microARN
MMP	Matrix Metalloprotease
MOPS	Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
NAC	N-acétyl-cystéine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NAS	NAFLD Activity Score
NASH	Non alcoholic steatohepatitis
NFκB	Nuclear factor-kappa B
NK	Natural killer
NKT	Natural killer T
NO	Monoxyde d'azote
NorUDCA	Norursodeoxycholic acid
NOX	NADPH oxydase
NPL	Nanoparticules lipidiques
OCA	Obeticholic acid
p53	Tumor protein 53
Pb	Paire de bases
PBS	Phosphate buffer solution
PC	Phosphatidylcholine
PCBP2	Poly(rC)-binding protein 2
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PEG	Poly éthylène glycol
PEI	Polyéthylénimine
PFA	Paraformaldéhyde
pHSC	primary Hepatic stellate cell
PLA	Polylactic acid
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
qHSCs	quiescent hepatic stellate cell
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RAR	Retinoic acid receptor
RBP	Retinol-binding protein
RBPR	Retinol-binding protein receptor
RE	Réticulum endoplasmique
RF	Retinoid fluorescence
RISC	RNA-induced silencing complex
ROS	Reactive oxygen species
RXR	Retinoid X receptor
SC	Sous-cutané
SD	Standard diet
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SHG	Second Harmonic Generation

shRNA	short hairpin ribonucleic acid
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SNALP	Stable nucleic acid lipid particles
SREBP-1	Sterol regulatory element-binding protein 1
SYN	synaptophysine
TANGO1	Transport and Golgi organization protein 1
TG	Triglycérides
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
TGF-βR	Transforming Growth Factor-beta receptor
TIMP	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases
TLR	Toll-like receptors
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRAIL	Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
TRAILR	Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand receptor
TRPM7	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 7
TTR	Transthyréline
UDCA	Ursodeoxycholic acid
UPR	Unfolded protein response
UTR	UnTranslated Region
VA	Vitamine A
V-EGF	Vascular endothelial growth factor
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
XBP1	X-box binding protein 1

Introduction

- I. Foie et fibrose**
- II. Les approches thérapeutiques pour la fibrose hépatique**
- III. L'ARN interférence**
- IV. Les stratégies thérapeutiques à base d'ARN interférents**

Chapitre I : Foie et fibrose

1. Le foie

1.1 Généralités

Le foie est l'organe solide le plus volumineux du corps humain. Il est situé du côté droit sous le diaphragme (Figure 1). Son poids est d'environ 1,5kg chez l'adulte, ce qui représente 2% du poids corporel. Il contient environ 10% du volume sanguin total, et environ 1,4L de sang traverse le foie chaque minute (pour un adulte). Il présente une vascularisation particulière, dite « mixte » puisqu'un tiers du sang provient de l'aorte *via* l'artère hépatique, apportant au foie l'oxygène et l'énergie, et deux tiers du sang proviennent du tube digestif *via* la veine porte apportant les éléments nutritifs absorbés au niveau des intestins.

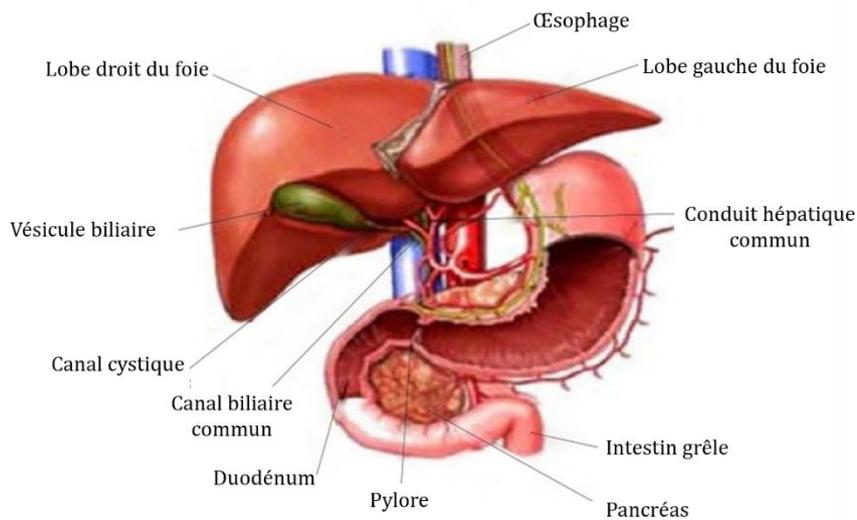


Figure 1 : Anatomie du foie et sa relation macroscopique avec le tractus intestinal et le système vasculaire. Image adaptée de (Tanwar et al., 2020).

1.2 Fonctions

1.2.1 Le métabolisme des glucides

Le foie assure le stockage des glucides sous forme de glycogène, par la voie de la glycogénogenèse. Lors d'une période de jeûne, le glycogène est transformé en glucose par les cellules hépatiques puis libéré dans la circulation sanguine afin de maintenir la glycémie entre 0,8 et 1g/L. Cette voie métabolique est appelée : la glycogénolyse. En cas d'épuisement

de ses réserves en glycogène, le foie est également capable de synthétiser du glucose à partir d'éléments non-glucosidiques, notamment les acides aminés.

1.2.2 Le métabolisme des lipides

Les lipides sont stockés dans les cellules hépatiques sous forme de triglycérides, cette voie est appelée la lipogénèse. Les triglycérides peuvent être hydrolysés, en cas de besoin énergétique, en acides gras. Ces derniers vont servir à la production d'énergie *via* le cycle de Krebs, après leur oxydation en acétylcoenzyme A. De plus, le foie est impliqué dans la synthèse des lipoprotéines qui assurent le transport dans la circulation sanguine des acides gras, des triglycérides et du cholestérol. Le foie assure également la synthèse des phospholipides et du cholestérol et le stockage des vitamines liposolubles comme les vitamines A, D, E et K.

1.2.3 Le métabolisme des protéines

Les cellules hépatiques sont capables de synthétiser des protéines, en particulier des enzymes, mais également de les éliminer sous forme d'urée qui sera excrétée dans l'urine. Le foie assure la production de la majorité des protéines plasmatiques, telles que l'albumine, la protéine la plus abondante du sang, l'hémoglobine, la globuline, le fibrinogène, les facteurs de coagulation et les inhibiteurs de protéases.

1.2.4 La production de la bile

La bile est composée principalement de bilirubine (produit de dégradation de l'hémoglobine), des acides et sels biliaires, du cholestérol, des phospholipides. Chaque jour, le foie produit environ 1L de bile, sécrétée par les cellules hépatiques de manière continue. Cette bile est stockée dans la vésicule biliaire, puis libérée au niveau du duodénum après un repas. La bile a pour rôle de solubiliser les graisses, en agissant comme émulsifiant, pour permettre leur absorption. Elle permet également l'excrétion des déchets endogènes liposolubles tels que le cholestérol et les pigments biliaires (issus de la dégradation de l'hémoglobine par le foie), mais aussi exogènes tels que les métabolites des xénobiotiques.

1.2.5 La détoxification

Les substances toxiques arrivant au foie sont soit endogènes, comme les produits de dégradation des protéines ou d'autres molécules, soit exogènes tels que les médicaments, l'alcool, les drogues et les pesticides. Le foie assure la dégradation de ces produits toxiques en produits non toxiques. Ces derniers sont éliminés dans le sang, s'ils sont hydrosolubles, et transportés vers les reins pour être excrétés dans les urines, comme l'alcool (éthanol) qui est transformé en acétate avant son élimination. En revanche, si ces produits sont liposolubles,

comme la bilirubine, ils seront excrétés dans la bile au niveau des intestins puis éliminés dans les selles. Les cytochromes (CYP) 450 sont des enzymes qui jouent un rôle essentiel au cours du processus de biotransformation des xénobiotiques dans le foie.

1.2.6 La régénération

Le foie possède une capacité régénérative très importante. Il est capable de reconstituer les lobules hépatiques même après une hépatectomie importante ou une lésion tissulaire toxique, ischémique ou encore due à une infection aiguë (Duarte et al., 2015). Il possède un mécanisme remarquable de prolifération des hépatocytes qu'il met en place en situation pathologique.

1.3 Organisation du foie

Le foie humain est constitué principalement de quatre lobes : le lobe hépatique droit (le plus volumineux), le lobe gauche (plus petit), et entre les deux on retrouve le lobe carré et le lobe caudé. La vésicule biliaire est située au niveau du lobe hépatique droit. Le foie est composé de millions de lobules hépatiques, de structure hexagonale, qui représentent l'unité fonctionnelle du foie (Figure 2).

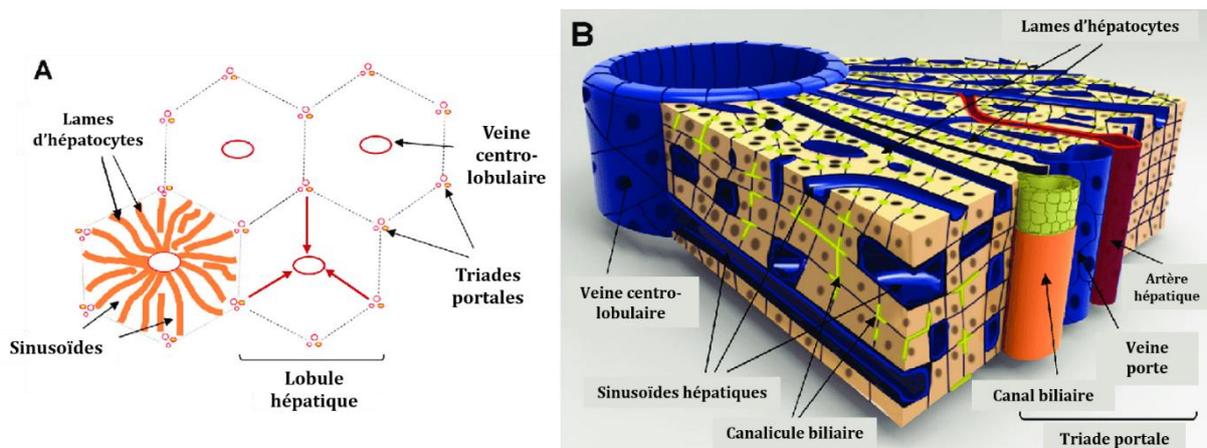


Figure 2 : Représentation schématique de l'architecture du foie et du lobule hépatique.

Image adaptée de (Lecluyse et al., 2012).

Chaque lobule est composé de milliers d'hépatocytes. Les espaces portes sont situés à la périphérie de chaque lobule, ils comprennent trois éléments : le canal biliaire (où est sécrétée la bile), une branche de l'artère hépatique (apportant le sang oxygéné de l'aorte), et une branche de la veine porte (apportant le sang riche en éléments nutritifs absorbés au niveau des intestins). La veine hépatique, également appelée veine centro-lobulaire est située au centre du lobule. Le sang provenant de la veine porte et de l'artère hépatique circule dans le réseau des capillaires sinusoides qui bordent les travées d'hépatocytes et convergent vers la veine centro-lobulaire (Figure 2). Les cellules endothéliales des sinusoides ne sont pas

jointives afin de permettre les échanges, entre le sang et les hépatocytes, de macromolécules mais également la migration de petites cellules, notamment les cellules de Kupffer et les hématies. Entre les cellules endothéliales et les travées d'hépatocytes, se situe l'espace de Disse, ou l'espace péri-sinusoïdal (Figure 3).

1.4 Les cellules hépatiques

Le foie est composé principalement d'hépatocytes, qui constituent environ 66% des cellules hépatiques, de macrophages résidents du foie appelés cellules de Kupffer, de cellules endothéliales sinusoïdales, de cellules stellaires, de cholangiocytes, de neutrophiles... Les principales cellules hépatiques seront détaillées ci-dessous (Figure 3).

1.4.1 Les hépatocytes

Les hépatocytes contiennent environ 90% de la masse protéique totale (D'Ambrosio et al., 2011a). Ces cellules épithéliales volumineuses ont des microvillosités permettant d'augmenter leur surface d'échange avec le sang. Les travées d'hépatocytes sont souvent sous forme de monocouche cellulaire séparée de part et d'autre des capillaires sinusoïdes par les espaces de Disse. Les hépatocytes peuvent être mono ou binucléés, avec un noyau rond qui représente entre 5 et 10% du volume total de la cellule. Leur division est très rare (environ 1 événement sur 20000) dans un foie sain. Les hépatocytes assurent les principales fonctions exocrines et endocrines du foie, avec une activité métabolique très importante. On retrouve donc un cytoplasme riche en réticulum endoplasmique, lysosomes et mitochondries. Selon leur localisation dans le lobule, les hépatocytes peuvent présenter des voies métaboliques différentes voire opposées. Par exemple, les hépatocytes péri-portaux vont assurer plus particulièrement l'oxydation des acides gras, la néoglucogenèse, alors que les hépatocytes péri-centro-lobulaire vont plutôt assurer la glycolyse et la lipogenèse.

1.4.2 Les cellules endothéliales sinusoïdales

Les cellules endothéliales sinusoïdales du foie sont des cellules non parenchymateuses qui forment les capillaires sinusoïdes. Comme évoqué précédemment, ces cellules ne sont pas jointives ; l'endothélium présente des pores avec d'importantes fenestrations permettant l'échange bidirectionnel de lipoprotéines et d'autres nutriments entre le sang et les cellules hépatiques. Elles favorisent également l'élimination des déchets présents dans le sang des sinusoïdes. Elles présentent une activité d'endocytose importante. Contrairement aux hépatocytes, ces cellules ont une plus petite taille et possèdent un noyau aplati (Figure 3) (Arriazu et al., 2014; DeLeve et al., 2004).

1.4.3 Les cellules de Kupffer

Les cellules de Kupffer ou macrophages résidents du foie sont situées dans la lumière des capillaires sinusoides et possèdent de longs prolongements cytoplasmiques (Figure 3). Ces cellules jouent un rôle vital dans le maintien de l'homéostasie hépatique. En effet, elles présentent une capacité importante de phagocytose et participent à l'élimination des pathogènes présents dans le sang provenant de la veine porte. Elles jouent également un rôle important dans la défense immunitaire, notamment en sécrétant des cytokines inflammatoires et en agissant comme cellules présentatrices d'antigènes (Dou et al., 2020).

1.4.4 Les cellules stellaires

Les cellules stellaires hépatiques (HSCs), également appelées cellules de Ito ou encore lipocytes, représentent 6 à 8% des cellules du foie. Elles contiennent 1% des protéines hépatiques et sont localisées dans l'espace péri-sinusoïdal (D'Ambrosio et al., 2011a) (Figure 3). Leur principal rôle est le stockage des rétinoïdes (vitamine A). Ces cellules seront décrites plus en détail dans la section 3 de ce chapitre.

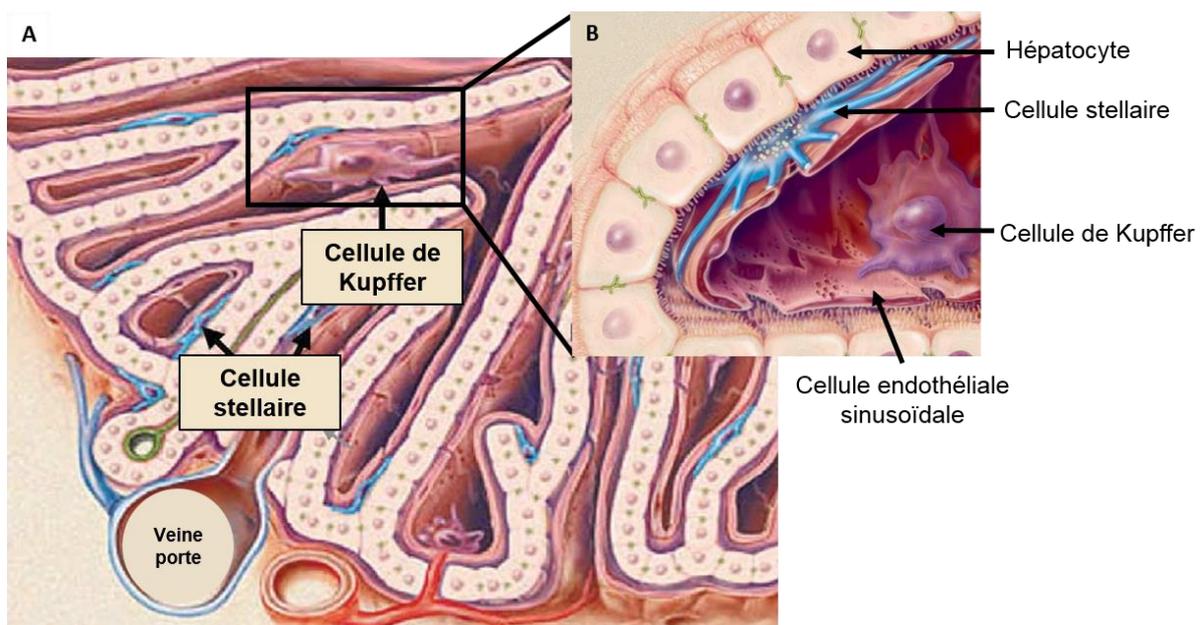


Figure 3 : Schémas décrivant la structure du lobule hépatique et du sinusoïde. Image adaptée de (Friedman, 2003).

1.5 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) du foie forme un microenvironnement complexe constitué d'un réseau organisé de macromolécules situées autour des espaces portes, de la veine centro-lobulaire et, en faible quantité, dans l'espace de Disse. Dans le lobule hépatique, les sinusoides sont dépourvus de membrane basale. La MEC est caractérisée par une

configuration particulière qui, en plus des fenestrations de l'endothélium sinusoidal, semble idéalement adaptée pour faciliter l'échange bidirectionnel rapide de macromolécules entre le plasma et les hépatocytes. En plus de son rôle structural, la MEC fournit un environnement optimal pour le fonctionnement cellulaire, elle est impliquée dans la régulation du comportement des cellules hépatiques (prolifération, migration, adhérence et survie) et dans le maintien du phénotype cellulaire. Elle joue également un rôle de réservoir de facteurs de croissance et de cytokines, et module les réponses des cellules aux stimuli. Dans un foie sain, la MEC représente 3% du poids du foie, et est composée de différentes classes de macromolécules qui incluent les différents types de collagène, les glycoprotéines comme la laminine et la fibronectine, et les protéoglycanes (Friedman, 1993; Hernandez-Gea and Friedman, 2011; Iredale et al., 2013; Lee and Friedman, 2011; Zhu et al., 2013).

L'interaction entre la MEC et les cellules hépatiques est essentielle pour l'homéostasie cellulaire. La modification de la matrice entraîne une perturbation de la fonction hépatique. L'interaction MEC/cellules se fait grâce à des récepteurs intégrines et non intégrines qui permettent un échange bidirectionnel d'informations entre les cellules et leur environnement (Wight and Potter-Perigo, 2011). Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques composés de sous-unités α et β et possèdent un domaine globulaire qui leur permet de lier les composants de la MEC (Hernandez-Gea and Friedman, 2011; Patsenker and Stickel, 2011).

Il existe un processus dynamique entre la synthèse et la dégradation de la MEC. L'équilibre entre ces deux phénomènes est maintenu grâce aux enzymes présentes dans la matrice, notamment les métallo-protéases matricielles ou MMPs (*Matrix Metalloproteases*) et leurs inhibiteurs. Les MMPs ont pour rôle de dégrader les composants de la matrice. Elles appartiennent à la famille des endopeptidases zinc-dépendantes regroupant 25 membres classés en cinq catégories en fonction de la spécificité de leur substrat : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les métallo-élastases, et les métallo-protéases de type membranaire.

Plusieurs types de cellules hépatiques peuvent exprimer les MMPs, comme les cellules stellaires, les hépatocytes, les cellules de Kupffer et les neutrophiles (Iredale, 1997). Ces MMPs sont sécrétées sous forme de proenzymes inactives, puis clivées à la surface cellulaire ou dans le milieu extracellulaire pour être activées. Leur activité est également modulée par une famille d'inhibiteurs de protéases endogènes appelés TIMPs (*Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases*). A ce jour, quatre inhibiteurs de MMPs ont été identifiés se liant de manière réversible au site actif de toutes les MMPs, mais avec des affinités différentes (Campana and Iredale, 2017; Roderfeld, 2018).

1.5.1 Le collagène

Le collagène est la principale protéine fibrillaire présente dans la MEC, il représente environ 30% des protéines totales du corps et possède une structure très caractéristique. En effet, il est composé de 3 chaînes polypeptidiques de procollagène α qui se lient entre elles pour former une triple hélice appelée tropocollagène. Il existe environ une trentaine de chaînes α différentes selon leur composition en acides aminés. Ainsi, l'association entre les 3 chaînes peut être homo ou hétéro-trimérique, ce qui signifie que les 3 chaînes ne sont pas forcément identiques. Par exemple, le collagène de type I est constitué de deux chaînes $\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$. L'assemblage côte à côte et bout à bout des molécules de collagène forme des microfibrilles. Ces dernières fusionnent en fibrilles matures après leur réticulation *via* la lysyl oxydase. L'assemblage des fibrilles forme les fibres de collagène. Le collagène possède une composition en acides aminés particulière : une répétition de 3 acides aminés (Gly-X-Y)_n, X étant une proline et Y une hydroxyproline le plus fréquemment (Figure 4). Cette séquence spécifique offre une certaine stabilité et rigidité à la molécule de collagène. A ce jour, 28 types de collagènes codés par 49 gènes ont été identifiés. En fonction de leur structure moléculaire et de leur organisation supramoléculaire, les différents types de collagène ont été regroupés en plusieurs sous-familles.

- Les collagènes fibrillaires (I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII) : ce sont les plus abondants et les plus largement distribués dans l'organisme. Ils jouent essentiellement un rôle mécanique et sont souvent associés en fibrilles.
- Les collagènes FACITs ou *Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helix* (IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII) : c'est la plus large sous-famille de collagène. Ils ne forment pas eux-mêmes des fibrilles, mais lient la surface des fibrilles de collagène préexistantes contribuant à l'élargissement des fibrilles. ;
- Les collagènes formant des réseaux (IV, VI, VIII, X) : ces types de collagène sont constitués de chaînes triple hélice flexibles leur permettant de former des associations linéaires, axiales et latérales, au sein des réseaux de protéines. Les collagènes de type VIII et X sont des molécules hétéro-trimériques à chaîne courte, très homologues, qui forment des réseaux hexagonaux (Arriazu et al., 2014).
- Les collagènes des fibrilles d'ancrage (VII),
- Les collagènes transmembranaires (XIII, XVII, XXIII, XXV),
- Les collagènes à domaines en triple hélice multiples ou multiplexines (XV, XVIII)
- Les autres collagènes (XXVI, XXVIII).

Une analyse par spectrométrie de masse réalisée sur des biopsies hépatiques humaines a mis en évidence que les collagènes représentaient plus de 60% des molécules de la MEC du

foie humain, tandis que les protéines non collagènes et les protéoglycanes contribuaient respectivement à 28,8% et 6,4% des composants de la matrice (Baiocchi et al., 2016). Dans un foie sain, on trouve majoritairement les collagènes de type IV et VI, qui ont un rôle essentiellement structural pour maintenir l'intégrité du foie. Le collagène de type IV est présent dans l'espace de Disse non associé à la laminine (Mak et al., 2013). Le collagène de type VI, majoritairement produit par les HSCs dans un foie sain, est un hétéro-trimère de trois chaînes α différentes (α_1 , α_2 , α_3) qui, une fois sécrété, s'agrège en filaments pour former un réseau micro-fibrillaire liant plusieurs protéines matricielles (Arriazu et al., 2014; Gelse et al., 2003; Li et al., 2015a). Le collagène XV α 1 a été identifié comme étant un marqueur des myofibroblastes portaux (Lemoine et al., 2015).

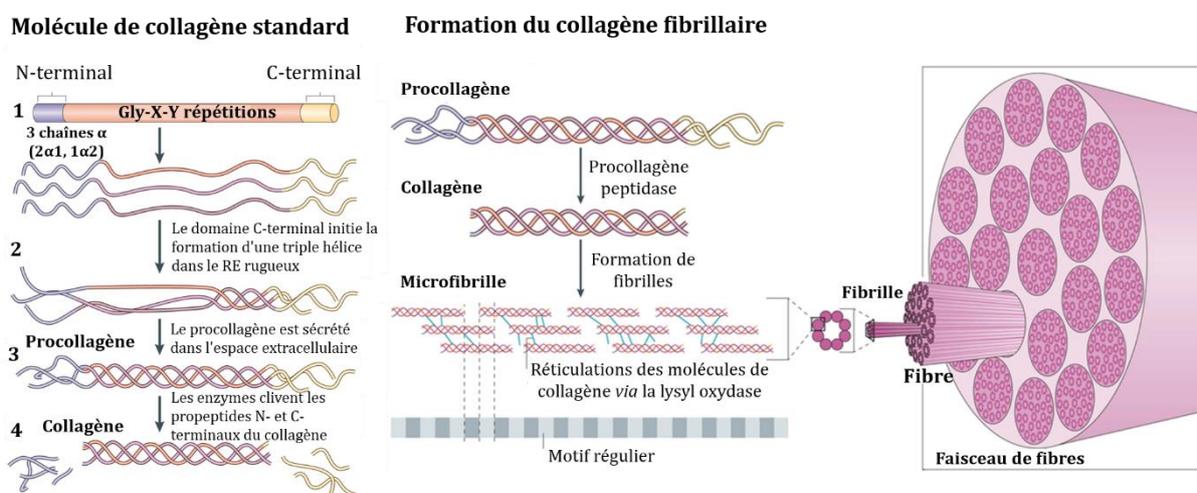


Figure 4 : Structure et assemblage du collagène fibrillaire.

(1) La molécule de collagène fibrillaire standard est caractérisée par des séquences N- et C-terminales, et des répétitions Gly-X-Y. (2) Formation de la structure hélicoïdale centrale du procollagène. Les trois chaînes α (l'illustration montre deux chaînes α_1 et une chaîne α_2 , qui est représentative du collagène de type I) sont assemblées pour former la triple hélice. (3) Le procollagène est sécrété par les cellules dans l'espace extracellulaire et (4) converti en collagène par l'élimination des domaines N- et C-terminaux *via* les métallo-protéases. Le collagène est ensuite assemblé en microfibrilles striées. Ces dernières fusionnent en fibrilles matures par croissance longitudinale et axiale. Pour former des fibres matures, la lysyl oxydase catalyse la formation de réticulations covalentes intramoléculaires et intermoléculaires entre les molécules de collagène. Image adaptée de (Mouw et al., 2014).

1.5.2 Les autres composants de la MEC

La MEC hépatique contient également des glycoprotéines comme la laminine, l'entactine et la fibronectine et des protéoglycanes tels que la ténascine, la décorine et le biglycane (Zhu et al., 2013).

1.5.2.1 La fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine de haut poids moléculaire qui se lie à la fois aux récepteurs intégrines présents sur la membrane cellulaire et aux composants de la MEC comme le collagène et les protéoglycanes (Figure 5). Elle joue un rôle majeur dans

l'adhérence, la migration et la différenciation cellulaire. Il a été décrit qu'une altération de son expression, de sa dégradation et de son organisation était associée à la fibrose et au cancer. En effet, en réponse à des atteintes hépatiques, la fibronectine est sécrétée par les cellules endothéliales sinusoidale et contribue à la modification de la MEC (Arriazu et al., 2014).

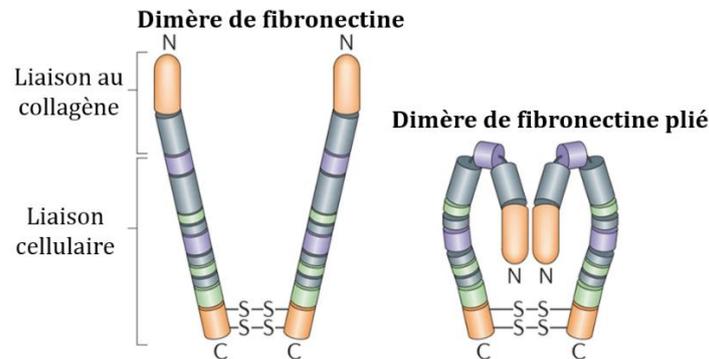


Figure 5 : Structure de la fibronectine.

La fibronectine forme un dimère par le biais de liaisons disulfures à son extrémité C-terminale. La molécule de fibronectine se plie pour révéler des sites de liaison cryptiques pour d'autres molécules de fibronectine, et pour des récepteurs de surface cellulaire lors de l'interaction avec les cellules. Image adaptée de (Mouw et al., 2014)

1.5.2.2 La laminine

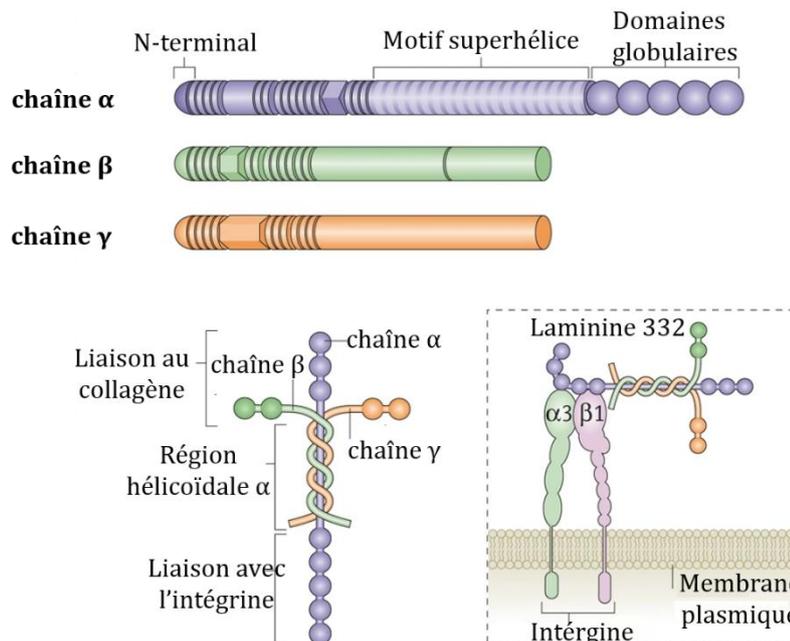


Figure 6 : Structure de la laminine.

Les laminines sont formées par l'incorporation de chaînes α , β et γ dans une structure cruciforme, en forme de Y ou en forme de tige. Elles interagissent avec les récepteurs de surface cellulaire, tels que les intégrines, principalement *via* les domaines globulaires de leurs chaînes. Image adaptée de (Mouw et al., 2014).

La famille des laminines représente au moins six glycoprotéines hétéro-trimériques codées par huit gènes différents. Elle est composée de trois chaînes protéiques (α , β , γ) et possède des domaines impliqués dans l'interaction avec les intégrines présentes à la surface cellulaire

(Figure 6). Comme la fibronectine, les laminines modulent la différenciation, la migration et l'adhérence des cellules, ainsi que le phénotype et la survie dans presque tous les tissus (Arriazu et al., 2014). Il a été décrit que dans un foie sain, la laminine est exprimée uniquement au niveau des membranes basales des espaces porte et des veines centro-lobulaires, où elle joue un rôle de support pour les cellules endothéliales. Cependant, elle est absente des sinusoides et donc de l'espace de Disse et n'entre pas en contact avec les hépatocytes (Häussinger and Kordes, 2019; Mak et al., 2013; Zhu et al., 2013).

1.5.2.3 Les protéoglycanes

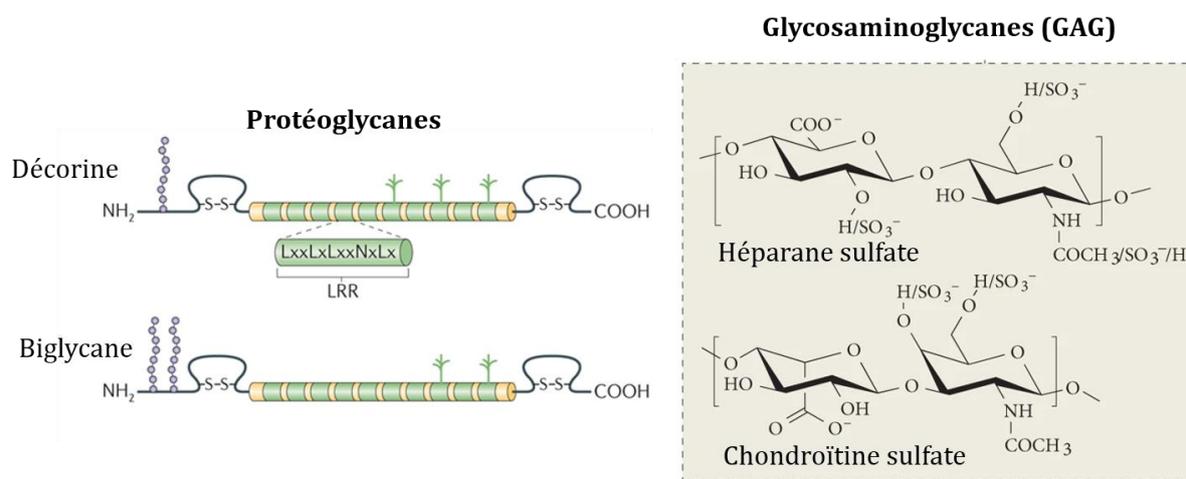


Figure 7 : Représentation de certains protéoglycanes et GAG.

La décorine et le biglycane sont des protéoglycanes majeurs caractérisés par des différences dans leur structure amino-terminale et des répétitions riches en leucine (LRR) hautement conservées dans la molécule centrale. Les principaux GAG comprennent l'héparane sulfate et la chondroïtine sulfate, dont les structures chimiques sont représentées à droite. Image adaptée de (Mouw et al., 2014).

Les protéoglycanes, tels que la décorine et le biglycane, sont des protéines hautement hydrophiles associées à des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) (Figure 7). Les chaînes GAG de protéoglycanes sont constituées d'unités disaccharidiques répétitives, chacune contenant un acide uronique et une hexosamine acétylée ou sulfatée (D-glucosamine, N-acétyl-D-glucosamine ou N-acétyl-D-galactosamine). Les GAG sont également présents seuls dans le foie, non associés aux protéoglycanes. Parmi ces GAG on trouve les héparanes sulfate (acide glucuronique et N-acétyl-D-glucosamine), les dermatanes sulfate (acide iduronique et N-acétyl-galactosamine), les chondroïtines sulfate (acide glucuronique et N-acétyl-galactosamine), l'acide hyaluronique et l'héparine. L'héparane sulfate est le principal GAG présent dans le foie, suivi de la chondroïtine sulfate (Figure 7) et du dermatane sulfate, et semble interagir avec la laminine et la fibronectine de la MEC. En raison de leur capacité à retenir l'eau, les protéoglycanes contribuent à l'assemblage de la MEC et à la régulation de sa rigidité dans le foie. Ils participent également à la régulation de nombreuses cascades de signalisation *via* la séquestration des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance

des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (V-EGF), et la présentation de ces derniers à leurs récepteurs présents à la surface des cellules (Arriazu et al., 2014; Baghy et al., 2016; Zhu et al., 2013).

2. Maladies hépatiques métaboliques

2.1 Maladies non alcooliques du foie

Le syndrome métabolique regroupe plusieurs pathologies notamment l'obésité, le diabète de type 2, la résistance à l'insuline, les maladies coronariennes, l'hypertension artérielle, l'hypertriglycéridémie et les atteintes hépatiques de type stéatose non alcoolique (Smith and Adams, 2011). La cause principale du syndrome métabolique est la suralimentation, qui engendre un déséquilibre entre les apports nutritionnels et les dépenses énergétiques. Des prédispositions génétiques peuvent également être impliquées dans l'apparition ou dans l'évolution de ces pathologies (Gonzalez-Bulnes et al., 2012).

En raison de l'augmentation de la prévalence du syndrome métabolique, les maladies non-alcooliques du foie (NAFLD, *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*) ont connu une incidence croissante au cours de ces dernières années et représentent actuellement un enjeu de santé publique (Estes et al., 2018). Les NAFLD présentent un spectre allant de la simple stéatose hépatique à la stéato-hépatite non alcoolique ou NASH (*Non Alcoholic SteatoHepatitis*), accompagnée éventuellement par une fibrose. Cette dernière peut aboutir à une cirrhose voire à un hépatocarcinome pour les stades les plus sévères de la maladie.

La stéatose hépatique est caractérisée par une accumulation de lipides dans les hépatocytes (Figure 8). Le transport de ces lipides vers les tissus périphériques est dérégulé voire interrompu. L'obésité constitue la principale cause de la stéatose hépatique qui peut rester bénigne, n'entraînant pas de dommages aux cellules hépatiques, mais peut également induire une inflammation chronique du foie. L'association de la stéatose hépatique à l'inflammation et à la souffrance hépatocellulaire définit la stéato-hépatite non alcoolique ou NASH (Figure 8). La NASH peut présenter des degrés plus ou moins variables de fibrose. Parmi les patients NASH, environ 40% développent une fibrose hépatique (Lanthier, 2018).

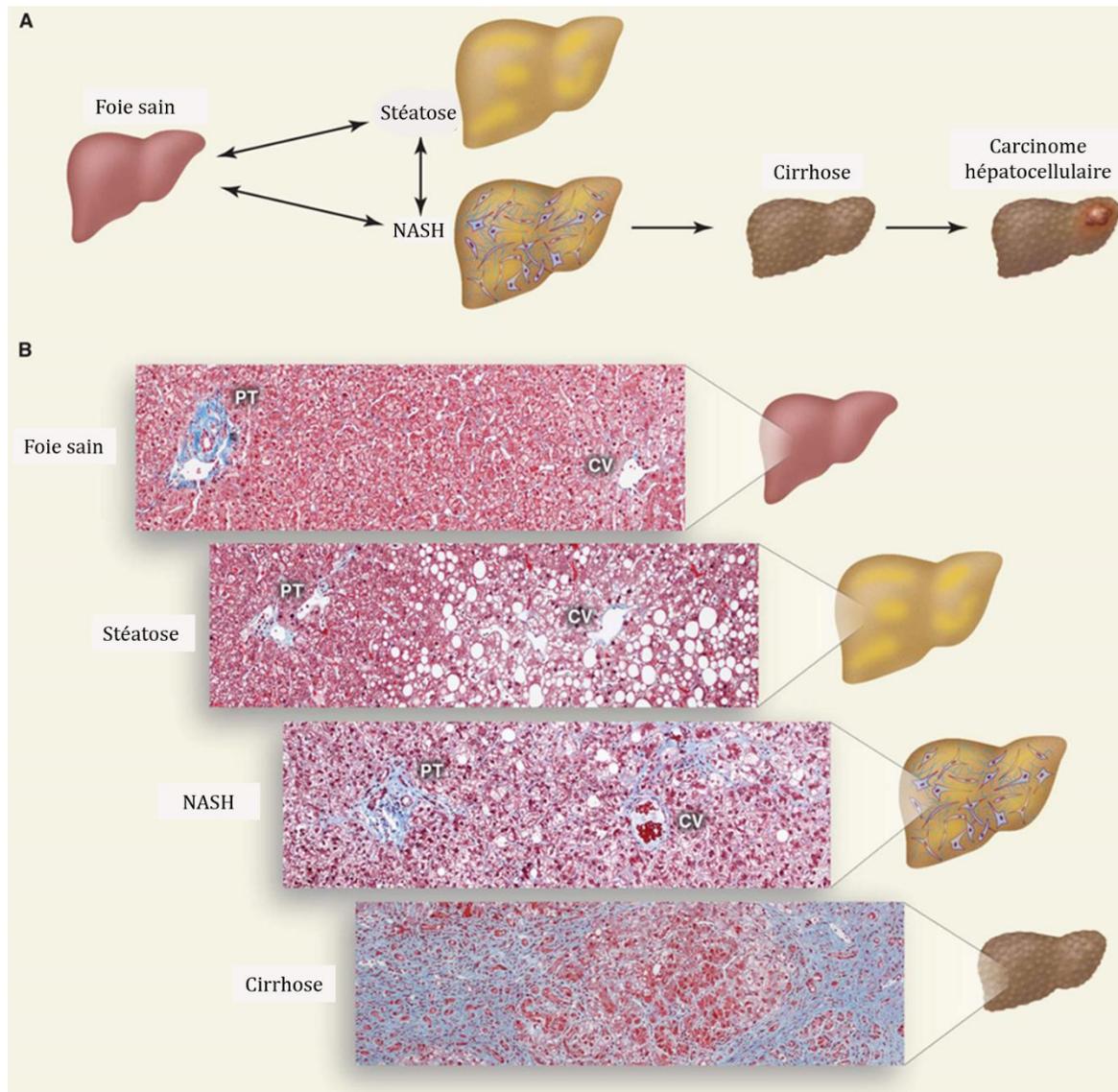


Figure 8 : Le spectre de la maladie de la stéato-hépatite non alcoolique.

(A) Schéma de la progression des stades de la maladie du foie. L'accumulation de triglycérides (TG) dans les gouttelettes lipidiques des hépatocytes provoque une stéatose. La stéatose associée à l'inflammation, à la mort cellulaire et à la fibrose est appelée NASH, qui peut évoluer en cirrhose. Les personnes atteintes de cirrhose ont un risque accru de carcinome hépatocellulaire. (B) Coupes histologiques illustrant un foie sain, la stéatose, la NASH et la cirrhose. Les fibres de collagène sont colorées en bleu (trichrome de Masson). La triade portale (PT), ainsi que la veine centro-lobulaire (CV) sont représentées. Image adaptée de (Cohen et al., 2011).

2.2 Fibrose hépatique

La fibrose hépatique est une conséquence des maladies chroniques du foie, qu'elles soient métaboliques (NAFLD, NASH), virales (Hépatite B, C), alcooliques, toxiques ou autre (Figure 9). Elle est caractérisée par une accumulation de tissu cicatriciel (essentiellement des fibres de collagène) dans le foie, associée à une inflammation chronique du foie. Cette accumulation est due à un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des composants matriciels.

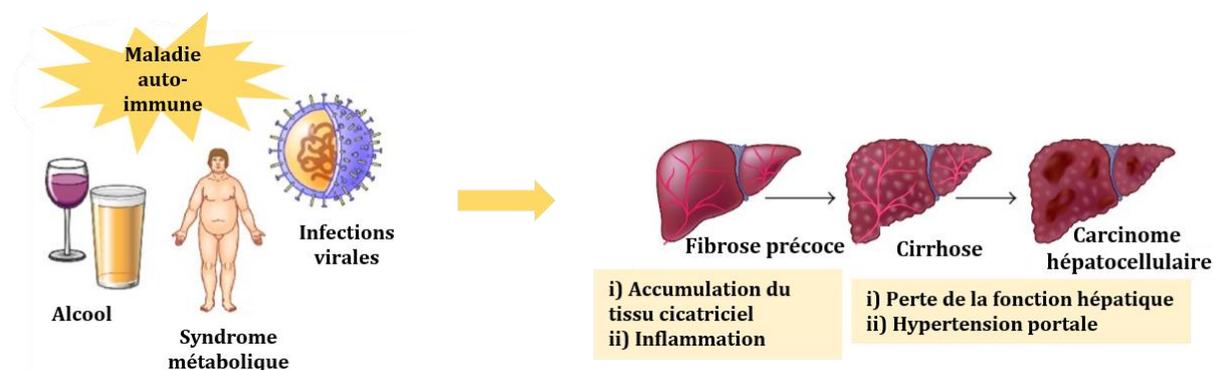


Figure 9 : développement et progression de la fibrose hépatique.

Une lésion hépatique déclenchée par des infections virales chroniques, une consommation excessive d'alcool, des troubles métaboliques ou une maladie auto-immune entraîne le développement d'une fibrose hépatique. L'accumulation de tissu cicatriciel dans le foie et l'inflammation conduisent à une fibrose progressive aboutissant finalement à une cirrhose associée à une perte de la fonction hépatique et une hypertension portale, ou un carcinome hépatocellulaire. Image adaptée de (Bansal et al., 2016).

On peut distinguer plusieurs stades de fibrose allant d'une fibrose légère à une fibrose sévère. Elle est cliniquement silencieuse, à progression lente et principalement asymptomatique. Les premiers symptômes de l'insuffisance hépatique dans la plupart des cas indiquent une évolution de la maladie en cirrhose et cela se produit généralement après 15 à 20 ans, lorsque les pronostics de survie et de récupération sont considérablement réduits. Malgré les fortes capacités de régénération du foie, il lui est alors impossible d'assurer certaines de ses fonctions, pourtant vitales à l'organisme. A ce stade, des complications se manifestent par la formation d'ascite, une hypertension portale, une insuffisance hépatocellulaire voire une encéphalopathie (due à la diminution de la capacité du foie à détoxifier le sang) (Figure 9). Par ailleurs, les patients atteints de cirrhose peuvent ne pas présenter de complications pendant plusieurs années, on parle alors de cirrhose compensée, qui est asymptomatique dans 40% des cas. Une cirrhose décompensée est associée à une espérance de vie courte. Le risque d'hépatocarcinome (CHC) est évalué à 7,5% à 5 ans en cas de cirrhose. La fibrose hépatique représente une étape charnière dans l'évolution de la NASH vers une cirrhose et un hépatocarcinome (Bansal et al., 2016; Lanthier, 2018; Zhao et al., 2019).

A l'heure actuelle, il n'existe aucune molécule anti-fibrotique approuvée pour la fibrose hépatique, la seule option thérapeutique envisageable est la transplantation hépatique pour les patients qui sont au dernier stade de la maladie.

2.3 Epidémiologie

Les maladies chroniques du foie (CLD) quelle que soit leur étiologie représentent un problème de santé publique majeur qui a touché 1,5 milliard de personnes dans le monde en 2017, et qui est la cause d'environ 2 millions de décès par an (Stanaway et al., 2018).

Il a été décrit que la prévalence des principales causes de CLD est restée stable, à l'exception de celle des NAFLD, qui augmente régulièrement. Les NAFLD représentent 75% des cas de CLD aux Etats-Unis, entre 2005 et 2008 contre 47% entre 1988-1994 (Younossi et al., 2011). Aujourd'hui, les NAFLD représentent la première cause de CLD dans le monde (Setiawan et al., 2016). On estime que leur prévalence mondiale est de 25% (Younossi et al., 2016). De plus, ces chiffres ne cessent de croître en raison de l'augmentation de l'incidence de l'obésité. En effet, la prévalence de NAFLD est de 16,4% chez les individus de poids normal (indice de masse corporelle (IMC) $<25 \text{ kg / m}^2$), de 75,8% chez les individus obèses (IMC $> 30 \text{ kg / m}^2$), et va jusqu'à 96% chez les obèses morbides subissant une chirurgie bariatrique (Estes et al., 2018; Friedman et al., 2018a).

Les NAFL évoluent en NASH chez environ 10% des patients, soit 2,5 à 5% de la population adulte. Parmi les patients NASH, environ 40,8 % développent une fibrose hépatique (Lanthier, 2018; Younossi et al., 2016). On estime que la prévalence d'une fibrose avancée (F2-F4) dans une population européenne, âgée de 18 à 75 ans, sans maladie hépatique connue, est de 2,6%. L'extrapolation de ces données à l'ensemble de la population européenne (738 millions en 2016) indique qu'environ 10 millions de citoyens européens, sans aucune maladie hépatique connue, présentent une fibrose hépatique importante (Caballería et al., 2018). En France, la prévalence d'une fibrose avancée (F2-F4) est de 2,8% dans la population générale, avec la maladie alcoolique du foie et la NASH qui constituent les principales causes de cette fibrose (Poynard et al., 2010).

Le dernier stade de la fibrose est la cirrhose, l'une des principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde qui cause environ 1 million de décès par an (Lurie et al., 2015; Maepa et al., 2018; Schuppan and Kim, 2013). Sa prévalence est de 0,27% chez les adultes américains, et de 0,4% dans une population européenne âgée de 18 à 75 ans, sans aucune maladie hépatique connue, ce qui représente environ 1,5 millions de citoyens européens (Caballería et al., 2018; Friedman et al., 2018a). En France, la prévalence de la cirrhose était de 0,3% en 2010 (Poynard et al., 2010). Aux États-Unis, le taux de mortalité en cas de cirrhose est très élevé, il représente 26,4% (Scaglione et al., 2015).

Dans certains cas, la fibrose évolue directement en cancer du foie. Il a été rapporté que 35 à 50% des hépatocarcinomes (CHC) survenant dans la NASH se manifestent avant que les patients ne soient cirrhotiques, ce pourcentage est très élevé si on le compare aux autres maladies du foie (Friedman et al., 2018a). En Angleterre, le nombre de patients atteints de CHC associé à l'hépatite C, à une maladie alcoolique du foie ou à aucune maladie hépatique chronique a augmenté de 2 à 3 fois en 10 ans contre une augmentation >10 fois pour le CHC associé aux NAFLD (Dyson et al., 2014).

En résumé, la prévalence des NAFLD augmente avec le syndrome métabolique. La stéatose bénigne peut rester stable pendant plusieurs années sans provoquer de complications hépatiques. En revanche, chez les patients atteints de NASH, la maladie évolue souvent vers une fibrose et une cirrhose avancées ou encore un hépatocarcinome, accompagnés de taux de mortalité élevés, d'où la nécessité d'un suivi adéquat des patients.

2.4 Evaluation clinique de la fibrose hépatique

La fibrose précoce est difficile à diagnostiquer car elle est souvent asymptomatique (Poilil Surendran et al., 2017). En pratique clinique, l'identification de la fibrose sévère ou de la cirrhose est le critère d'évaluation le plus important lors de la prise en charge des patients atteints de NAFLD (Castera, 2018).

2.4.1 Technique invasive : La biopsie hépatique

La biopsie hépatique est considérée comme le « *gold standard* » pour déterminer l'étendue de la maladie du foie et le degré de fibrose. Malgré ses limites, elle reste la technique la plus fiable pour l'évaluation de la maladie (Poilil Surendran et al., 2017).

2.4.1.1 Technique

Pour réaliser une biopsie hépatique, on utilise une aiguille pour retirer un petit échantillon de tissu hépatique sous anesthésie locale (Poilil Surendran et al., 2017). La taille de l'échantillon varie de 1 à 3 cm de longueur et de 1,2 à 2 mm de diamètre (Castera, 2018). L'échantillon est ensuite fixé puis évalué par le médecin pathologiste après coloration histologique des coupes. Il existe 2 types de coloration : l'Hématoxyline et l'Eosine qui permet de visualiser la morphologie du tissu et le Sirius Red ou le Trichrome de Masson permettant d'observer les fibres de collagène. Le médecin peut alors observer et déterminer le degré de stéatose (présence de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes), d'inflammation (présence de foyers d'infiltration de cellules inflammatoires) et de formation de septa fibreux dans les différentes zones lobulaires (péri-portale, péri-centrale, péri-sinusoïdale...).

Selon l'étiologie de la fibrose, il existe différents systèmes de score permettant d'évaluer le degré de la maladie (ex HAI, Scheuer, ISHAK ou METAVIR) (Poilil Surendran et al., 2017). Pour évaluer les NAFLD, le score NAS (*NAFLD Activity Score*), décrit par Kleiner et al., est le plus utilisé actuellement (Kleiner et al., 2005). Il permet de quantifier la stéatose (0 à 3), la ballonnisation hépatocytaire (0 à 2) et l'inflammation (0 à 3) selon des critères bien définis. La classification de la fibrose diffère de la classification de METAVIR, utilisée pour les maladies

hépatiques virales. Le stade 1 est défini par une fibrose sinusoidale péri-centro-lobulaire, discrète (1a), modérée (1b) ou péri portale (1c). Le stade 2 correspond à une fibrose sinusoidale péri-centro-lobulaire et péri-portale. Le stade 3 est défini par la présence de septa fibreux, et le stade 4 correspond à une cirrhose (Tableau 1).

Grade	Stéatose	Inflammation	Ballonisation	Fibrose
0	<5%	0	Aucun	Absence
1	5-33%	<2	Quelques-uns	Péri-centro-lobulaire (a : discrète, b : modérée), c : péri-portale.
2	34-66%	2-4	Nombreux	Péri-centro-lobulaire et portale
3	67-100%	>4	-	Septa fibreux
4	-	-	-	Cirrhose
Score NAS = somme des grades de stéatose-inflammation-ballonisation 0-2 : pas de NASH, 3-4 : Borderline, 5-8 : NASH				

Tableau 1 : Score de NAS et fibrose

2.4.1.2 Limites

La biopsie hépatique n'est pas toujours précise et présente plusieurs limites bien connues (Poilil Surendran et al., 2017) :

- i) Il s'agit d'une procédure invasive associée à des douleurs transitoires, de l'anxiété et de l'inconfort dans environ 30% des cas, et des complications rares mais potentiellement mortelles (hémorragie dans 0,3% des cas et mortalité dans 0,01%) (Castera, 2018). Des effets secondaires liés à l'anesthésie locale peuvent également se manifester ;
- ii) Erreur d'échantillonnage due à la petite taille de l'échantillon de biopsie qui représente seulement 1/50 000 de la masse totale du foie et peut donc être non représentatif de l'organe (Castera, 2018). Par exemple, il a été démontré que seulement 65% des biopsies de 15 mm et 75% des biopsies de 25 mm étaient correctement évaluées. Cette erreur d'échantillonnage peut également être due à l'hétérogénéité de la fibrose. En effet, une différence d'au moins un stade de fibrose a été signalée entre les lobes droit et gauche chez environ 30% des cas (Castera, 2018) ;
- iii) La variabilité intra et inter-observateurs peut atteindre 30%, conduisant à une sur- ou sous-estimation de la fibrose. Le degré d'expérience du pathologiste (spécialisation, années de pratique et pratique universitaire) peut également influencer sur l'accord entre observateurs (Castera, 2018). Pour pallier à ces limites, l'utilisation de la technique de microscopie par génération de seconde harmonique (*Second Harmonic Generation*, SHG) pourrait être d'un grand intérêt pour l'évaluation du score de fibrose de manière automatisée basée sur les

caractéristiques architecturales du collagène et éviter les erreurs de lecture (Chang et al., 2018).

La SHG est une technique d'imagerie optique non linéaire qui permet de visualiser le collagène fibrillaire sur des coupes de foie, sans réaliser de colorations histologiques ou de marquages spécifiques. L'intérêt de la SHG pour étudier la fibrose a été proposé pour la première fois dans les années 2000 (Pena et al., 2007). Cette technique présente plusieurs avantages tels que la sensibilité et la spécificité élevées du signal détecté pour le collagène, la combinaison possible avec la microscopie de fluorescence, et enfin la quantification des dépôts de collagène. Plusieurs groupes de recherche ont ensuite développé des méthodes de quantification du collagène et de scores de fibrose sur des modèles animaux mais également chez l'humain (Gailhouste et al., 2010; Strupler et al., 2007; Sun et al., 2008; Tai et al., 2009). Cependant, à l'heure actuelle, l'utilisation de cette technique comme outil d'imagerie est limitée aux laboratoires de recherche. La prochaine étape serait de l'utiliser comme un outil de diagnostic dans le domaine médical.

2.4.2 Techniques non invasives

Ces techniques reposent sur deux approches différentes mais complémentaires : la mesure des niveaux de biomarqueurs sériques, et l'estimation de la rigidité hépatique à l'aide de techniques d'élastographie par ultrasons (Castera, 2018).

Les outils de diagnostic non invasifs sont mieux tolérés, plus sûrs et beaucoup moins chers que la biopsie hépatique. Par conséquent, leur utilisation est en augmentation, et dans certains pays le nombre de biopsies effectuées, au moins pour l'évaluation des hépatites B et C, a fortement diminué (Lurie et al., 2015).

2.4.2.1 Dosages sanguins

Plusieurs marqueurs biochimiques peuvent être dosés afin d'évaluer la fibrose, comme les niveaux sériques d'aminotransférase, de phosphatase alcaline, de prothrombine, d'acide hyaluronique, et de TIMP-1. Cependant, ces marqueurs ne sont pas strictement spécifiques du foie et peuvent refléter la présence de fibrose dans d'autres organes. C'est pourquoi de nouveaux tests ont été développés. Ce sont des combinaisons de plusieurs paramètres sanguins, optimisés pour déterminer les stades de la fibrose, tels qu'évalués par biopsie hépatique (Castera, 2018). La méthode la plus utilisée et qui semble la mieux corrélée avec le degré de fibrose est le Fibrotest de la société Bio Protective (Paris, France) combinant le dosage de 5 marqueurs différents (gamma-glutamyl transpeptidase, haptoglobine, bilirubine, apolipoprotéine A1 (Apo A1), alpha-2-macroglobuline) (Imbert-Bismut et al., 2001). D'autres tests sanguins existent également comme APRI, Fib-4, Fibrometer, HepaScore (Lurie et al.,

2015). Cependant, les tests biologiques discriminent difficilement les degrés intermédiaires de fibrose. Ainsi, si un test sanguin indique une fibrose du foie, une biopsie hépatique sera souvent effectuée (Poilil Surendran et al., 2017).

2.4.2.2 Elastographie

L'élastographie impulsionnelle à vibration contrôlée, mesure la rigidité du foie liée à son élasticité, ce qui correspond à une propriété physique intrinsèque du parenchyme hépatique. En effet, l'élasticité du foie diminue avec l'accumulation de collagène dans la MEC, ce qui se traduit par une augmentation de la raideur du foie. Le Fibroscan de la société EchoSens (Paris, France) a été la première méthode d'élastographie utilisée pour évaluer l'élasticité du foie (Sandrin et al., 1999). Un transducteur ultrasonique est placé au-dessus du foie, à la surface de la peau, à travers un espace intercostal. Il produit une vibration mécanique qui génère des ondes de cisaillement élastiques qui se propagent à travers le tissu (Figure 10). La vitesse avec laquelle ces ondes se propagent dans le foie est ensuite mesurée et exprimée en kilopascals. Cette vitesse est directement liée à l'élasticité du tissu. Plus le tissu est rigide, plus l'onde de cisaillement se propage rapidement. Le Fibroscan permet d'analyser 1/500 du volume du foie, il est indolore, rapide et simple à utiliser. De plus, il présente une reproductibilité importante, avec des résultats immédiatement disponibles. Par ailleurs, des études ont montré que l'élastographie est assez sensible pour faire la différence entre l'absence de fibrose et une fibrose légère, ou encore entre une fibrose modérée et une cirrhose importante. Cependant, elle n'est pas suffisamment précise pour différencier les stades de la fibrose légère, en particulier entre F0-1 et F2. L'élastographie présente d'autres limites qui incluent la nécessité d'un équipement coûteux et le manque de seuils standardisés pour le diagnostic des stades de la fibrose. De plus, son utilisation chez les patients souffrant d'obésité et d'ascite peut être limitée en raison d'une mauvaise pénétration (Lurie et al., 2015).

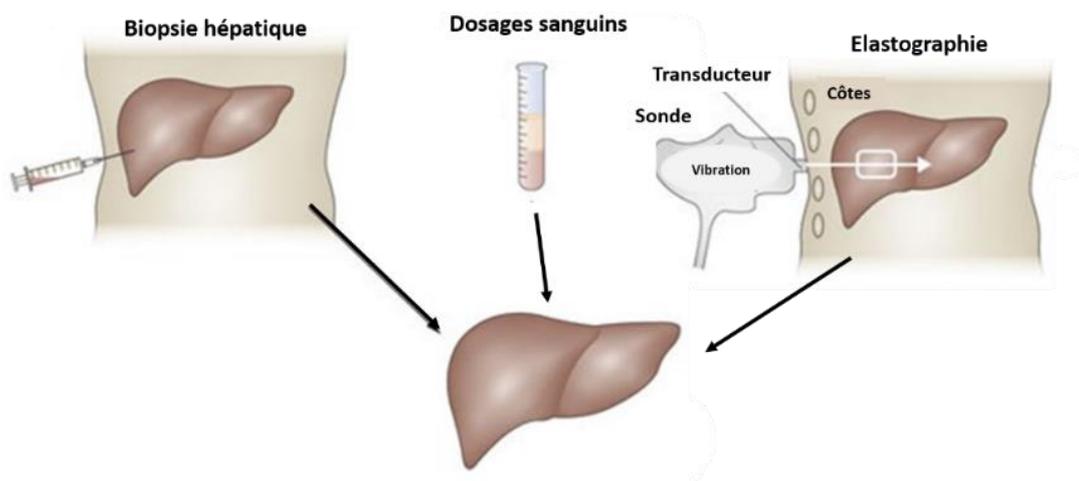


Figure 10 : Représentation des principales techniques d'évaluation de la fibrose hépatique.
Image adaptée de (Friedman, 2010).

Les méthodes non invasives pour l'évaluation de la fibrose hépatique sont maintenant utilisées dans la pratique clinique de routine et incluses dans les directives nationales et internationales. Une utilisation encore plus large de ces techniques permettrait sûrement d'éviter une grande partie des biopsies hépatiques. De plus, une combinaison entre les marqueurs sériques et les techniques physiques (comme le Fibrotest et le Fibroscan) pourrait être très efficace pour l'évaluation et le suivi de la fibrose. Cependant, ces méthodes restent moins précises que la biopsie hépatique, en particulier dans les premiers stades de la maladie (Castera, 2018; Chen et al., 2019; Lurie et al., 2015). Enfin, il existe d'autres techniques non invasives comme le CTScan qui sont en cours de développement.

2.5 Physiopathologie de la NASH

Une théorie, émise en 1998 par Day et James sur la pathogenèse de la NASH, repose sur un processus nommé « *two hits hypothesis* ». Elle suggère que les atteintes hépatiques interviennent en deux temps : un premier mécanisme induisant une accumulation de triglycérides dans les cellules hépatiques ; suivi par un deuxième mécanisme responsable d'une apoptose hépatocellulaire et de la formation de septa fibreux (Day and James, 1998). Cette hypothèse a été bien admise, pendant plusieurs années, par les scientifiques, pour expliquer la physiopathologie de la NASH. Cependant, avec l'évolution de la compréhension des NAFLD et de la NASH, de nouvelles hypothèses ont été émises, notamment la théorie nommée « *the multiple parallel hits hypothesis* » (Smith and Adams, 2011; Tilg and Moschen, 2010). Cette dernière repose sur le fait qu'il existe de nombreuses voies moléculaires contribuant au développement de la NASH, et que leurs manifestations cliniques sont très hétérogènes. En effet, il n'est même pas certain que la NASH soit toujours précédée par une stéatose simple (NAFL). De plus, les facteurs pathogènes ne sont probablement pas identiques chez tous les patients (Friedman et al., 2018a).

2.5.1 La stéatose hépatique

La stéatose est caractérisée par une accumulation de lipides dans les hépatocytes. Les triglycérides constituent les principaux lipides stockés dans le foie des patients NAFLD (Tilg and Moschen, 2010). Selon la morphologie des gouttelettes lipidiques présentes dans les hépatocytes, la stéatose peut être soit macro-vésiculaire, caractérisée par la présence de grosses vésicules lipidiques avec un noyau cellulaire à la périphérie, soit micro-vésiculaire, avec plusieurs petites vésicules lipidiques et un noyau central. Chez la majorité des individus NAFLD, la stéatose est principalement macro-vésiculaire, bien qu'elle puisse être mixte dans certains cas (Tilg and Moschen, 2010).

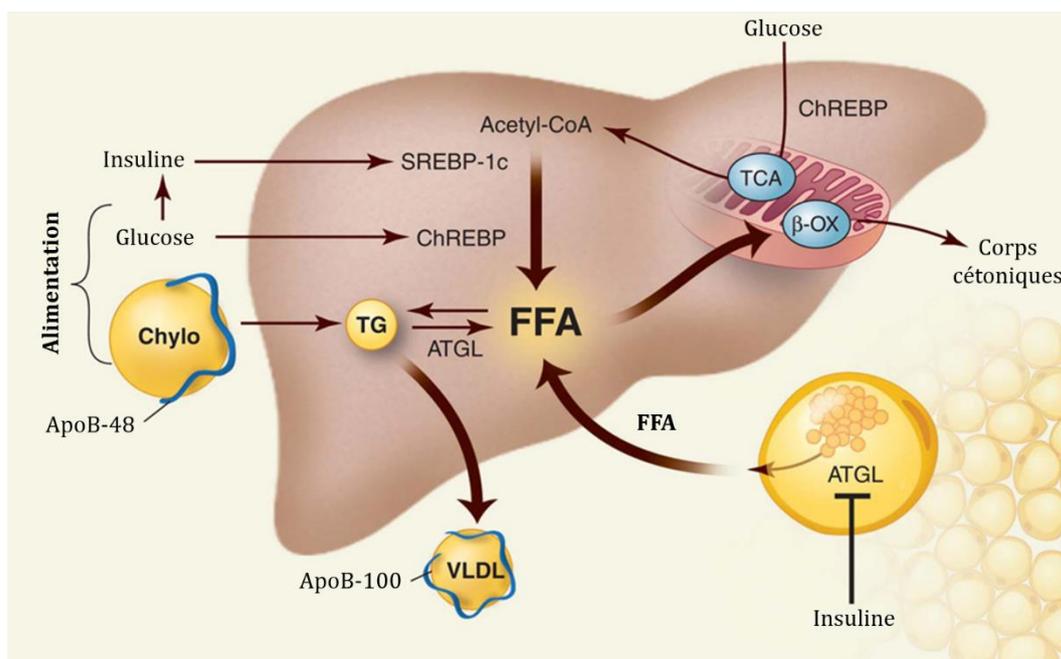


Figure 11 : Métabolisme des triglycérides dans le foie.

Les trois principales sources d'acides gras libres (FFA) sont l'alimentation, la synthèse endogène et les tissus périphériques. Les FFA ont quatre destins possibles. Ils peuvent être métabolisés par β -oxydation dans les mitochondries, estérifiés et stockés sous forme de TG dans des gouttelettes lipidiques, utilisés pour former d'autres lipides (non représentés), ou liés à l'apoB dans les VLDL et sécrétés dans le sang. Les processus qui augmentent les entrées des FFA et de TG ou réduisent leurs sorties provoquent une stéatose hépatique. L'apport en glucides augmente les niveaux de glucose et d'insuline, qui activent deux facteurs de transcription dans le foie favorisant la lipogenèse *de novo* : ChREBP et SREBP-1c. L'insuline inhibe la lipolyse dans le tissu adipeux en supprimant l'ATGL. (Abréviations : ATGL, adipocyte TG hydrolase ; Chylo, chylomicron ; FFA, *Free Fatty acids* ou acides gras libres ; TG, triglycérides). Image adaptée de (Cohen et al., 2011).

La stéatose est la conséquence d'un déséquilibre du flux lipidique qui peut être dû à un ou plusieurs mécanismes : (1) une augmentation de l'apport en graisses alimentaires de l'intestin au foie, en particulier chez les individus obèses chez qui la consommation de graisses saturées est très élevée ; (2) une augmentation de la libération des acides gras libres par le tissu adipeux (viscéral ou sous cutané), due à une lipolyse accrue. Ainsi, il a été démontré, chez des patients NASH, que 60% des acides gras hépatiques sont issus du flux d'acides gras venant d'un relargage du tissu adipeux sous-cutané (Anty and Gual, 2019) ; (3) une augmentation de la lipogenèse *de novo* dans le foie : les acides gras peuvent être néosynthétisés à partir du glucose lorsque les capacités de stockage du glycogène sont saturées. C'est la voie de la lipogenèse hépatique. Plusieurs facteurs de transcription lipogéniques ont été décrits comme étant surexprimés dans les NAFLD notamment XBP1, SREBP-1c et ChREBP (Figure 11) (Tilg and Moschen, 2010) ; (4) une diminution de l'oxydation des acides gras dans les hépatocytes : la voie de β -oxydation dans la mitochondrie est altérée chez l'individu insulino-résistant et/ou obèse présentant une stéatose. Cette voie ainsi que l'expression des protéines de transport des acides gras (FATPs) sont régulées par le récepteur activé par les proliférateurs de peroxydome α (PPAR- α) dont l'expression est diminuée chez les patients ayant une stéatose hépatique (Bechmann et al., 2012) ; (5) une

diminution de la sécrétion hépatique des triglycérides et leur export vers les autres organes. L'ApoB facilite l'exportation de lipides du foie en incorporant des triglycérides, avant d'être sécrétée en VLDL (*Very Low Density Lipoprotein* ou en français lipoprotéine de très basse densité) dans le sang (Figure 11). Dans des modèles animaux, mais également chez l'humain, des études ont montré que l'incorporation de triglycérides dans l'apoB est altérée et que la synthèse ou l'excrétion d'apoB est réduite dans les NAFLD (Smith and Adams, 2011). Un seul mécanisme parmi ceux cités ci-dessus, serait suffisant pour induire une stéatose hépatique (Savage and Semple, 2010). Cette stéatose serait un facteur protecteur pour le foie si elle n'est pas associée à des lésions hépatocytaires, et reste bénigne chez la majorité des patients (Anty and Gual, 2019). Cependant, des complications apparaissent lorsqu'elle progresse en stéato-hépatite ou NASH (Tilg and Moschen, 2010).

2.5.2 La stéato-hépatite ou NASH

La NASH est distinguée de la simple stéatose par la présence de lésions hépatiques, notamment la ballonnisation et l'apoptose hépatocellulaire, d'infiltrats inflammatoires et éventuellement de dépôts de collagène (Cohen et al., 2011).

Le stockage des triglycérides dans les hépatocytes est un phénomène physiologique. Cependant, l'accumulation excessive des acides gras libres ou encore des métabolites lipidiques comme les céramides a un effet toxique sur les hépatocytes (Friedman et al., 2018a). Le rapport des acides gras mono-insaturés sur les acides gras saturés s'avère être un déterminant majeur des lésions hépatocellulaires dans les NAFLD. Dans des modèles animaux et sur des lignées cellulaires d'hépatocytes, l'accumulation d'acides gras saturés entraîne une stéatose, des lésions hépatiques et une apoptose hépatocellulaire. Des études menées sur des souris suggèrent que les acides gras saturés interagissent avec les TLR (*Toll-like receptors*) entraînant une inflammation (Figure 12) (Alkhoury et al., 2009). Les cytokines pro-inflammatoires, en particulier le TNF- α et l'IL-6, jouent un rôle important dans le développement de la NASH. Des taux élevés de ces deux cytokines ont été retrouvés dans le sang des patients atteints de NASH, et leur inhibition a induit un effet bénéfique sur un modèle NAFLD chez le rongeur (Cohen et al., 2011).

Les acides gras libres ou FFA (*Free Fatty acids*) peuvent également se fixer et activer les récepteurs de mort cellulaire, tels que le récepteur Fas et TRAIL5, déclenchant l'apoptose des hépatocytes (Figure 12) (Alkhoury et al., 2009). Ils sont également susceptibles de rendre les hépatocytes plus sensibles aux stimuli de mort. Enfin, les FFA notamment le palmitate peuvent entraîner un stress oxydatif du réticulum endoplasmique conduisant la génération des espèces réactives d'oxygène (ROS) et l'apoptose des cellules (Poilil Surendran et al., 2017).

Les acides gras libres et le cholestérol sont également considérés comme des lipides agressifs pour la mitochondrie. Lorsqu'ils s'accumulent à l'intérieur, ces lipides toxiques peuvent altérer le fonctionnement mitochondrial (Figure 12) (Tilg and Moschen, 2010). Des défauts de structures mitochondriales et une altération fonctionnelle ont été démontrés chez des patients atteints de NASH (Cohen et al., 2011). Des études *in vitro* ont également montré que ces lipides entraînaient une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale et la formation de ROS (Alkhouri et al., 2009).

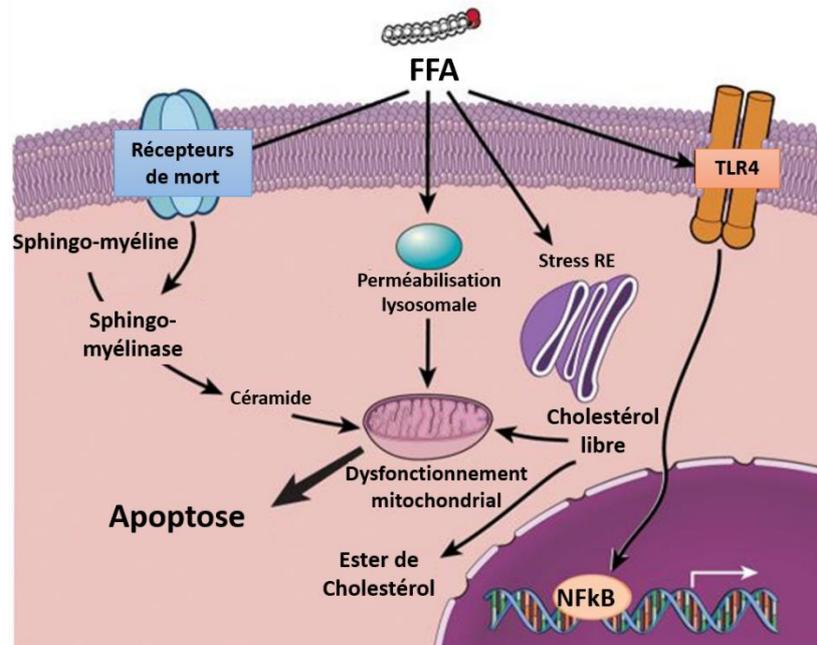


Figure 12 : Les voies de lipotoxicité dans les NAFLD

Les acides gras libres peuvent activer plusieurs voies d'apoptose, y compris l'augmentation de l'expression des récepteurs de mort cellulaire tels que Fas et TRAIL receptor 5 (DR5), au niveau de la membrane plasmique. La perméabilisation lysosomale et le stress du RE, couplés au dysfonctionnement mitochondrial entraînent l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. Ces acides gras toxiques peuvent également activer la signalisation TLR4 entraînant une régulation positive de plusieurs cytokines pro-inflammatoires. Enfin, d'autres types de lipides tels que le cholestérol libre et la céramide peuvent également induire un dysfonctionnement mitochondrial et activer la voie mitochondriale de l'apoptose. (Abréviations : FFA, acides gras libres ; RE, réticulum endoplasmique). Image adaptée de (Alkhouri et al., 2009).

Le stress oxydatif est un facteur nocif clé dans la physiopathologie de la NASH. Les principales sources de ROS dans le foie sont les hépatocytes, les cellules de Kupffer et les neutrophiles *via* l'activation des NADPH oxydases (NOX), en réponse aux pathogènes et aux stimuli inflammatoires (Arriazu et al., 2014).

L'autre mécanisme potentiellement impliqué dans la NASH est le stress du réticulum endoplasmique (RE) dû à la génération des ROS (Figure 12). L'accumulation de protéines mal-conformées dans le RE, induit une réponse UPR (*unfolded protein response*) dont l'activation conduit à un stress du RE. Cette réponse entraîne une activation de NFκB, de c-Jun N-terminal kinase et des voies de stress oxydatif impliquées dans la progression de la stéatose en NASH (Cohen et al., 2011).

2.5.3 La fibrose hépatique

La fibrose hépatique est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs types cellulaires. En effet, en réponse aux différents stimuli tels que les cytokines, les chimiokines, les corps apoptotiques, les ROS, des voies pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques sont activées. Ces dernières induisent une augmentation de la production de la MEC ainsi qu'une diminution de sa dégradation (Figure 13). Il a été décrit que le foie, dans les stades avancés de la maladie, contient environ 6 fois plus de MEC qu'un foie sain. La diminution de la dégradation de la MEC est due à une baisse de la production des protéases dégradant la matrice, mais aussi à une diminution de leur activité en raison de la surexpression de leurs inhibiteurs spécifiques : les TIMPs (Bataller and Brenner, 2005).

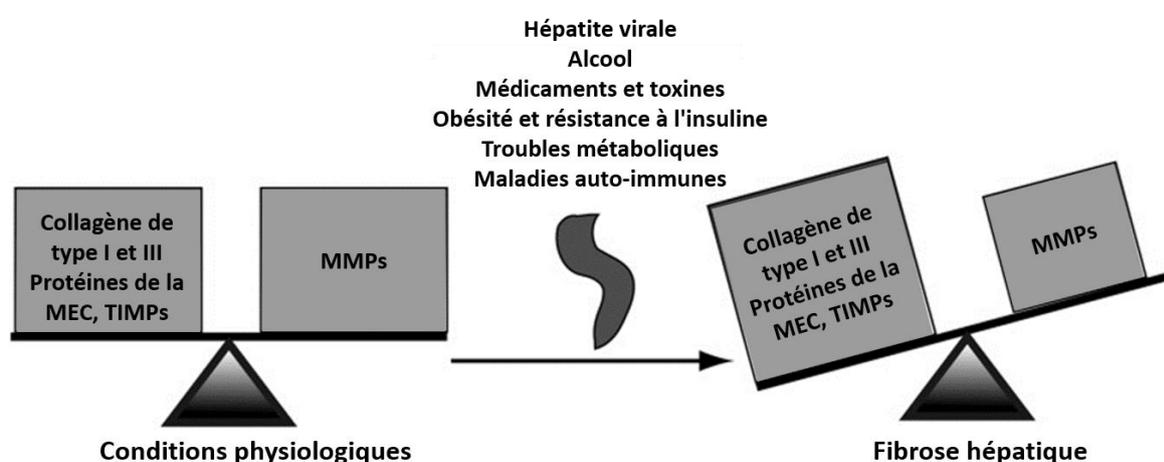


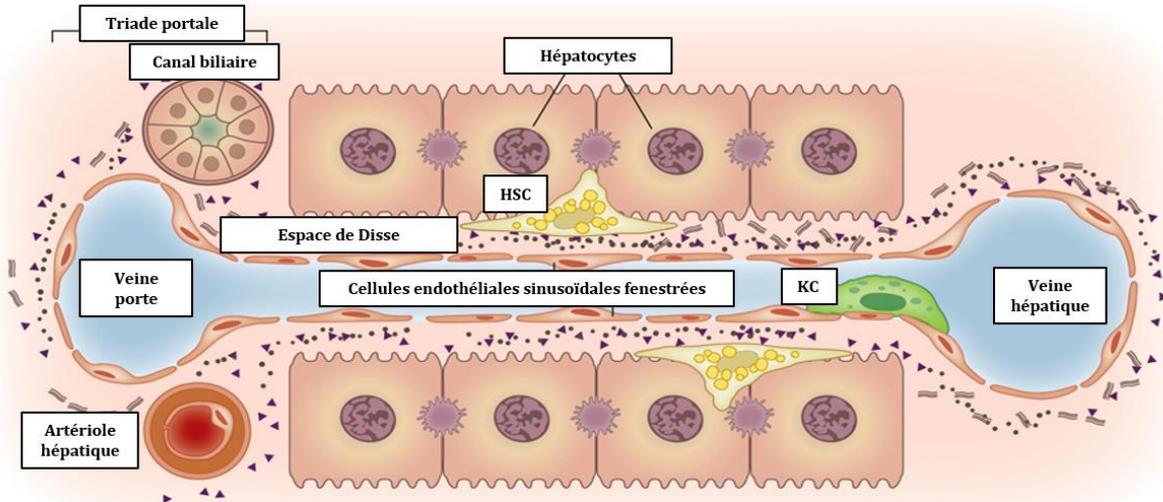
Figure 13 : Homéostasie de la MEC.

Dans des conditions physiologiques, l'homéostasie de la MEC implique un équilibre coordonné entre la synthèse et la dégradation des protéines de la matrice. Au cours de la fibrose, cet équilibre est perturbé et la composition de la MEC est généralement modifiée par le dépôt de collagène fibrillaire de type I et d'autres protéines, entraînant des changements pathologiques dans l'architecture hépatique. Image adaptée de (Arriazu et al., 2014).

Des changements qualitatifs des composants de la MEC sont également observés. Ainsi, les collagènes de type IV et VI, présents à l'état physiologique dans la matrice, sont remplacés par les collagènes de type I et III et la fibronectine. La distribution des dépôts fibreux de la MEC diffère selon l'étiologie des lésions hépatiques (Arriazu et al., 2014; Bataller and Brenner, 2005; Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Dans l'hépatite virale chronique et les troubles cholestatiques chroniques, le tissu fibreux est initialement situé autour des veines portes, tandis que dans une maladie hépatique induite par l'alcool, ou dans les NAFLD, il se situe dans les zones péri-sinusoïdales en région péri-centrale. Une fibrose à point de départ portale est rarement observée au cours de la NASH (Anty and Gual, 2019). L'accumulation de la MEC dans l'espace de Disse induit une perte de la fenestration des cellules endothéliales sinusoidales, ce qui provoque une altération de l'échange métabolique bidirectionnel normal entre le sang provenant de la veine porte et les hépatocytes (Figure 14). Ce processus est

appelé « la capillarisation des sinusoides ». Les cellules endothéliales sinusoidales contribuent également aux lésions hépatocytaires en sécrétant la fibronectine et en favorisant l'activation des HSCs *via* la production de TGF- β (Bataller and Brenner, 2005).

A- foie normal



B- foie fibrotique

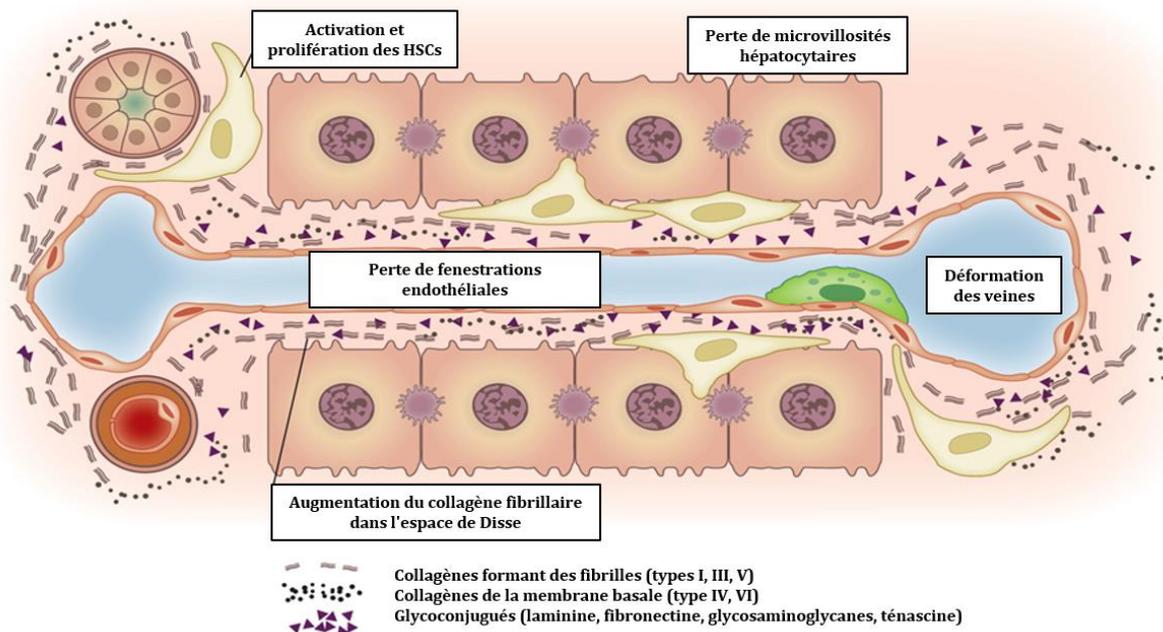


Figure 14 : Matrice et altération cellulaire dans la fibrose hépatique.

Le parenchyme hépatique sain contient des cellules épithéliales (hépatocytes) et des cellules non parenchymateuses (HSCs, cellules de Kupffer (KC)) et un endothélium sinusoidal fenestré. (A) Les sinusoides sont séparés des hépatocytes par une matrice semblable à une matrice de basse densité dans l'espace de Disse, qui assure l'échange métabolique. (B) En cas de lésion, les HSCs deviennent activées et sécrètent de grandes quantités de MEC, entraînant un épaissement progressif des septa. Le dépôt de MEC dans l'espace de Disse entraîne la perte des fenestrations endothéliales et des microvillosités hépatocytaires, ce qui induit à la fois une altération de l'échange métabolique bidirectionnel normal entre le flux veineux porte et les hépatocytes, et le développement d'une hypertension portale. Image adaptée de (Hernandez-Gea and Friedman, 2011).

Les cellules stellaires hépatiques (HSCs) sont les cellules majoritairement responsables de la production de cette MEC pathologique. Les atteintes hépatiques chroniques activent les HSCs et entraînent leur dédifférenciation en myofibroblastes possédant des propriétés contractiles, pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques (Bataller and Brenner, 2005). L'activation des cellules stellaires sera détaillée dans la partie 3.2 de ce chapitre.

En plus des HSCs, les fibroblastes portaux, présents dans le tissu conjonctif des espaces portes autour des canaux biliaires, peuvent potentiellement devenir des myofibroblastes fibrogéniques. Leur contribution à la fibrose est particulièrement importante dans les maladies biliaires. Des études récentes ont également proposé que les cellules épithéliales (les hépatocytes, les cholangiocytes et les cellules endothéliales) peuvent être à l'origine des myofibroblastes dans le foie par transition épithélio-mésenchymateuse. Ce processus permet à une cellule épithéliale, étroitement attachée avec une polarité apicale et basale, de migrer et de s'accumuler dans le tissu lésé et d'acquérir un phénotype de cellule mésenchymateuse (capacité de migration et de production de MEC). Enfin, des cellules dérivées de la moelle osseuse, comme les cellules souches mésenchymateuses et les fibrocytes circulants, peuvent être recrutées dans le foie pour devenir des myofibroblastes (Figure 15) (Brenner et al., 2012).

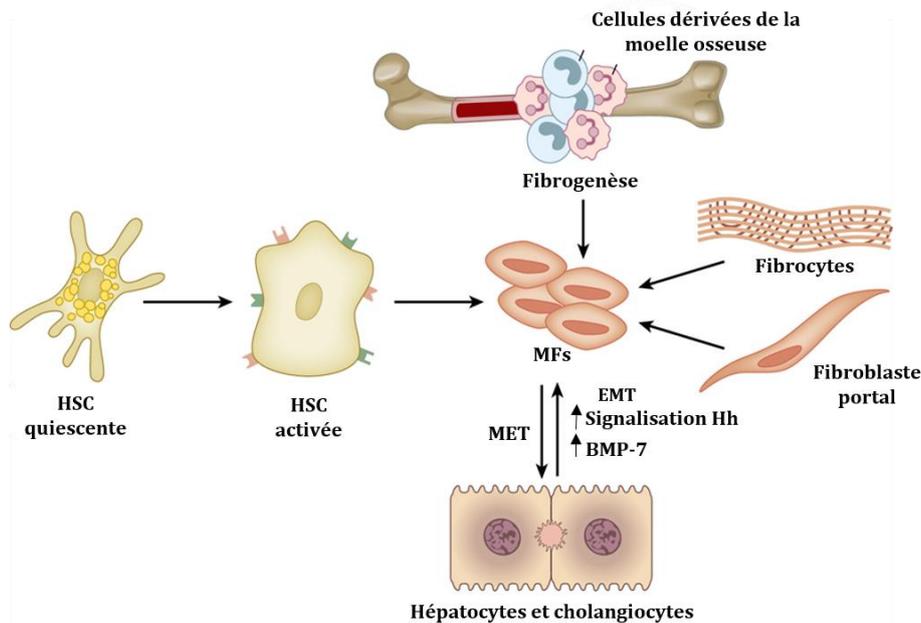


Figure 15 : Origine des myofibroblastes au cours de la fibrose hépatique.

La fibrose hépatique est caractérisée par la prolifération de myofibroblastes (MF) contractiles et fibrogènes. La source primaire et la mieux caractérisée de MF est les HSCs activées. D'autres cellules peuvent également se trans-différencier en MF. Ces cellules comprennent des cellules dérivées de la moelle osseuse, des fibroblastes portaux et la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des hépatocytes et des cholangiocytes. (Abréviations : BMP-7, protéine morphogénétique osseuse 7 ; EMT, transition épithélio-mésenchymateuse ; Hh, hémisphère ; MET, transition mésenchymateuse-épithéliale). Image adaptée de (Hernandez-Gea and Friedman, 2011).

3. Les cellules stellaires hépatiques

Les cellules stellaires hépatiques sont des cellules mésenchymateuses, connues également sous le nom de cellules étoilées du foie, lipocytes, cellules péri-sinusoïdales, cellules de Ito ou encore *fat storing cells*. Avec les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales, ces cellules font partie des cellules non parenchymateuses (Blaner et al., 2009). Elles ont été décrites pour la première fois par Carl von Kupffer en 1876 et ont été officiellement appelées cellules stellaires hépatiques en 1995. Comme évoqué précédemment, ces cellules sont localisées dans l'espace péri-sinusoïdal (espace de Disse), entre les hépatocytes (cellules parenchymateuses) et les cellules endothéliales. Dans un foie sain, elles représentent un tiers des cellules non parenchymateuses, environ 5-8% des cellules hépatiques totales et 1,4% du volume total du foie (Refaat et al., 2016; Tsuchida and Friedman, 2017; Weiskirchen and Tacke, 2014). Les HSCs présentent un phénotype quiescent non prolifératif (Tsuchida and Friedman, 2017). Elles possèdent une structure fusiforme avec un noyau ovale ou allongé, un réticulum endoplasmique rugueux modérément développé, un appareil de Golgi juxta-nucléaire et d'importants prolongements cytoplasmiques. Ces derniers jouent un rôle vital dans la détection et la transmission des signaux chimiotactiques, pour générer une force contractile. Grâce à ses prolongements cytoplasmiques, la cellule stellaire entre en contact avec les cellules voisines, ce qui peut faciliter le transport intercellulaire des médiateurs solubles et des cytokines (Friedman, 2008a). La caractéristique la plus connue des HSCs, dans un foie sain, est leur stockage des rétinoïdes (vitamine A) sous forme de gouttelettes de vitamine A ou rétinoïdes. Ce n'est, cependant, pas la seule.

3.1 Rôles des cellules stellaires dans un foie sain

3.1.1 Le stockage de la vitamine A

Dans un foie sain, 70% des rétinoïdes totaux de l'organisme sont stockés dans le foie, dont 90 à 95% dans les gouttelettes cytoplasmiques des HSCs, sous forme d'esters de rétinyle, principalement du palmitate de rétinyle (Blaner et al., 2009). La composition de ces gouttelettes est affectée par l'apport alimentaire. Elles contiennent non seulement des rétinoïdes, mais également des quantités importantes de triglycérides, de phospholipides, de cholestérol et d'acides gras libres (voir 3.4 Les rétinoïdes) (Friedman, 2008a).

3.1.2 Le remodelage de la MEC

Les HSCs sont impliquées dans les processus de synthèse et de dégradation de la MEC. Dans un foie sain, elles produisent plusieurs composants de la MEC, notamment les collagènes de type III et IV et la laminine. Les HSCs sécrètent également les enzymes impliquées dans le

remodelage de la MEC, comme les MMP-1, MMP-8 et MMP-13, et leurs inhibiteurs spécifiques, tels que TIMP-1 et TIMP-2 (Refaat et al., 2016).

3.1.3 Le développement et la régénération du foie

En entourant les sinusoides, les HSCs peuvent contrôler le flux sanguin à travers ces capillaires. Il a été décrit qu'une seule cellule stellaire entoure généralement plus de deux sinusoides proches, et qu'elles sont capables de sécréter des protéines vasoactives comme la substance P, le neuropeptide Y et la somatostatine (Friedman, 2008a; Geerts, 2001). Elles jouent également un rôle dans la régénération du foie, en particulier après une hépatectomie, en produisant des protéines morphogénétiques comme l'épimorphine, impliquée dans la régénération hépatique, le HGF et la pléiotrophine, qui stimulent la prolifération et la régénération des hépatocytes. Enfin, les HSCs stimulent la croissance des cellules endothéliales sinusoidales et vasculaires en exprimant V-EGF, et produisent plusieurs molécules régulant l'homéostasie, notamment le TGF- β , l'endothéline-1 et l'érythropoïétine (Refaat et al., 2016).

3.1.4 L'immuno-régulation

Les HSCs sécrètent des cytokines inflammatoires comme le TGF- β 1, la cytokine la plus fibrogénique, et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le plus puissant médiateur chimiotactique et mitogène. Les HSCs peuvent amplifier la réponse inflammatoire en induisant une infiltration de leucocytes mono- et poly-nucléaires. Elles produisent également des chimiokines et expriment des récepteurs qui peuvent stimuler la prolifération des lymphocytes ou l'apoptose (voir 3.2.4.2 Les chimiokines, page 61) (Brun et al., 2005).

3.2 L'activation des HSCs au cours de la fibrose hépatique

L'activation des HSCs en un phénotype de type myofibroblaste est un événement clé de la mise en place de la fibrose hépatique. Elle est divisée en deux phases majeures : l'initiation et la perpétuation qui peuvent parfois être suivies d'une phase de résolution (Friedman, 2004).

3.2.1 Phase d'initiation

Durant la phase d'initiation ou la phase pré-inflammatoire, les cellules hépatiques (hépatocytes endommagés et cellules de Kupffer), ainsi que les cellules inflammatoires recrutées, libèrent des médiateurs, tels que les ROS, les peroxydes lipidiques et les corps apoptotiques, qui vont, par stimulation paracrine, activer des facteurs de transcription dans les HSCs (Figure 16). Ainsi, l'initiation fait référence à des changements précoces de l'expression des gènes qui rendent les cellules stellaires plus sensibles aux signaux reçus des cellules adjacentes *via* la surexpression de certains récepteurs, en particulier les récepteurs au TGF- β et au PDGF. Par

conséquent, les cellules subissent une transformation d'un état quiescent en un état activé (Friedman, 2008a; Lee and Friedman, 2011).

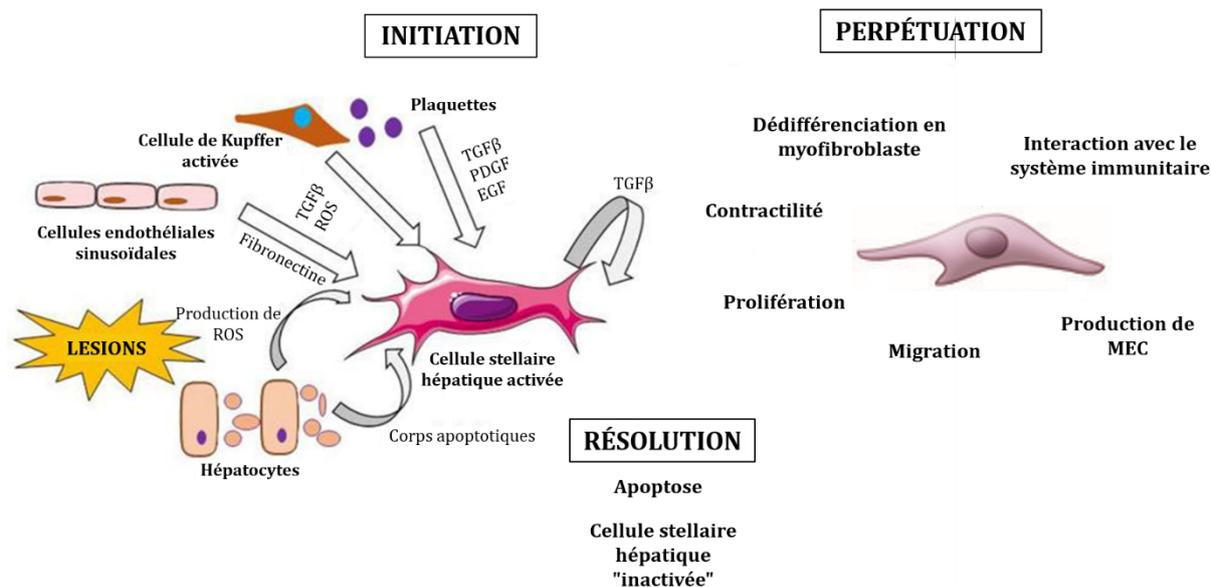


Figure 16 : Processus d'activation des cellules stellaires hépatiques.

En cas d'atteinte hépatique, les stimuli qui impliquent l'activation des HSCs proviennent des hépatocytes endommagés, des cellules endothéliales sinusoidales, des cellules de Kupffer et des plaquettes. En réponse à ces signaux, les HSCs sont capables de produire le TGF- β . La perpétuation conduit à des cellules plus actives capables de se contracter, de proliférer, de produire des protéines de la MEC, de migrer et d'interagir avec le système immunitaire. Cela déclenche des réponses inflammatoires et fibrogéniques et diminue l'apport sanguin. L'élimination des stimuli pro-fibrogéniques peut conduire à la résolution de la maladie par apoptose des HSCs activées, ou par la réversion en un phénotype inactif. Image adaptée de (Yanguas et al., 2016).

3.2.2 Phase de perpétuation

La perpétuation implique au moins six changements distincts dans le comportement des HSCs, y compris la prolifération, la chimiotaxie, la fibrogénèse, la contractilité, la dégradation de la matrice et la perte de rétinoïdes (Figure 16). Durant la phase de perpétuation, les HSCs sont maintenues dans un état dit « activé » sous l'effet des différents stimuli pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques, autocrines et paracrines. Elles prolifèrent, migrent et s'accumulent dans les zones lésées. Elles subissent une transformation phénotypique caractérisée par une perte des gouttelettes de rétinoïdes, une expression de l'actine du muscle lisse α (α -Smooth Muscle Actin, α -SMA), un réticulum endoplasmique rugueux plus important, accompagné d'un appareil de Golgi bien développé, suggérant une synthèse protéique active. Elles produisent de manière excessive de nombreux constituants de la MEC dont l'expression est multipliée par 50, quand les HSCs sont différenciées en myofibroblastes. Enfin, les HSCs activées, à leur tour, sécrètent des chimiokines et des cytokines inflammatoires, expriment des molécules d'adhérence cellulaire, et modulent l'activation des cellules immunitaires. Par conséquent, un cercle vicieux se produit dans lequel les cellules parenchymateuses et non-parenchymateuses

se stimulent mutuellement (Bataller and Brenner, 2005; Cheng and Mahato, 2007; Friedman, 2003, 2008a; Hernandez-Gea and Friedman, 2011; Raghow, 1994; Senoo et al., 1998).

3.2.3 Phase de résolution

Les HSCs activées peuvent, dans certains cas, aller soit vers un processus d'apoptose ou de sénescence, soit vers une réversion en cellules stellaires normales avec un phénotype similaire à l'état quiescent ; c'est ce qu'on appelle la phase de résolution (Friedman, 2008b; Lee and Friedman, 2011). Ces processus seront décrits dans le chapitre 2, page 92.

3.2.4 Mécanismes impliqués dans l'activation des HSCs

3.2.4.1 Les cytokines inflammatoires

Les cytokines inflammatoires jouent un rôle clé dans la fibrose, étant donné que l'inflammation persistante précède presque toujours la fibrose. Après une lésion hépatique, plusieurs types de cellules peuvent sécréter des cytokines inflammatoires y compris les cellules de Kupffer, les hépatocytes, les HSCs, les cellules naturelles tueuses (NK) et les lymphocytes (Hernandez-Gea and Friedman, 2011).

Le TGF- β représente un facteur clé dans la régulation de la prolifération des HSCs, et joue un rôle déterminant lors de la fibrogénèse en stimulant la synthèse du collagène (Figure 17) (Shen, 2003). Le TGF- β est majoritairement produit par les HSCs et, en plus faible quantité, par les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales (De Bleser et al., 1997). Ces deux types cellulaires participent également à la conversion du TGF- β natif en une forme active pro-fibrogénique (Friedman, 2003). Les cellules de Kupffer, par exemple, sécrètent du MMP-9 responsable de l'activation du TGF- β .

Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) est considéré comme le deuxième plus important médiateur de prolifération des HSCs (Chen et al., 2019). Il joue un rôle important dans l'initiation et la progression de la fibrose hépatique (Beljaars et al., 2003). Il est essentiellement produit par les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales et les HSCs elles-mêmes (Refaat et al., 2016). Durant le processus de fibrose, l'expression des PDGFs, en particulier des PDGF-A et PDGF-B, augmente de manière significative dans les HSCs activées, les cellules endothéliales et les macrophages. Les PDGF exercent leurs actions *via* deux récepteurs PDGFR- α et β , qui appartiennent à la famille des récepteurs tyrosine kinase, et qui sont généralement localisés dans les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales vasculaires et les cellules stellaires (Ying et al., 2017). Les récepteurs au PDGF sont exprimés à un niveau très faible dans les cellules hépatiques d'un foie sain, mais sont significativement surexprimés dans un foie fibrotique, en particulier PDGFR- β , à la fois dans des modèles animaux, mais aussi sur des biopsies humaines de patients atteints de fibrose (Borkham-

Kamphorst and Weiskirchen, 2016; Breitkopf et al., 2005; Campbell et al., 2005; Ying et al., 2017).

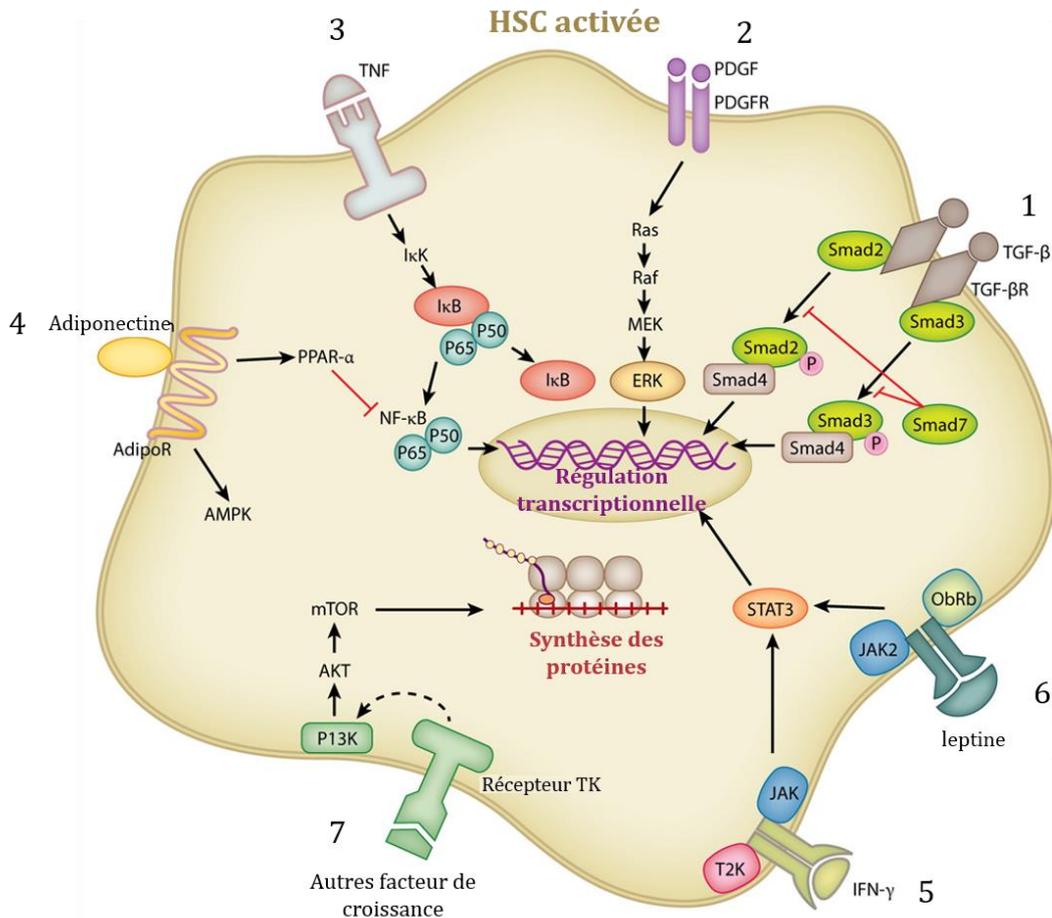


Figure 17 : Principales voies d'activation de HSCs.

Les lésions hépatiques sont suivies de la sécrétion de cytokines qui modulent l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires, principalement par leur liaison à des récepteurs spécifiques. (1) La dimérisation du récepteur TGF-βR, après la liaison au TGF-β, recrute les protéines Smad2 et Smad3, qui sont ensuite phosphorylées et libérées dans le cytosol, où elles peuvent s'associer à Smad4. Ces hétérodimères peuvent ensuite se transloquer dans le noyau et réguler la transcription des gènes fibrogéniques. (2) PDGF module sa régulation transcriptionnelle en partie par l'activation de la voie ERK après la liaison au récepteur PDGFR. (3) TNF, par sa liaison à son récepteur peut activer la voie NF-κB. (4) L'adiponectine, par sa liaison à son récepteur, AdipoR, peut agir *via* la signalisation des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxydases (PPAR-α). (5, 6) La leptine et l'interféron (IFN)-γ peuvent activer STAT3 et réguler la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans la fibrose hépatique. (7) Plusieurs autres facteurs de croissance peuvent activer les récepteurs tyrosine kinase, conduisant au recrutement de la phosphoinositol 3-kinase (PI3K) et à la phosphorylation de l'AKT. L'AKT activé régule la synthèse des protéines fibrogéniques *via* la voie mammifère cible de la rapamycine (mTOR). (Abréviations : JAK, Janus kinase ; NF-κB, facteur nucléaire Kb ; TK, tyrosine kinase). Image adaptée de (Hernandez-Gea and Friedman, 2011).

La contribution du TNF-α aux lésions hépatiques et à l'inflammation hépatocellulaires a été largement étudiée. Bien qu'il ne participe pas à l'activation des HSCs, le TNF-α joue un rôle important dans la prolifération cellulaire et dans la régulation de l'expression de TIMP-1 et MMP-9 *via* le récepteur 1 de TNF-α (TNFR1) (Arriazu et al., 2014).

Le facteur de croissance endothélial vasculaire (V-EGF) est libéré à la fois par les HSCs et par les cellules endothéliales sinusoidales dans le foie. Il est surexprimé pendant l'activation des HSCs et stimule la prolifération et la migration cellulaire. Il favorise la fibrogénèse, mais pourrait également être impliqué dans la réparation du tissu hépatique et la résolution de la fibrose (Tsuchida and Friedman, 2017). Le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) est une puissante cytokine fibrogénique faiblement exprimée dans le foie sain. Une augmentation de son expression a été mise en évidence au cours de la fibrose. Le CTGF contribue à la prolifération, la migration, l'adhérence et la survie des cellules ainsi qu'à la production de la MEC (Tsuchida and Friedman, 2017). D'autres facteurs de croissance comme le HGF, le FGF et l'IGF (*insulin-like growth factor*) sont également impliqués dans la fibrose hépatique (Hernandez-Gea and Friedman, 2011).

De plus, il a été décrit que les adipokines (cytokines du tissu adipeux) et l'interféron γ (IFN- γ) semblent contribuer à la régulation de la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation et la fibrose. Les adipokines, comme la leptine qui aurait un effet pro-fibrogénique, sont des polypeptides sécrétés principalement par les adipocytes et, en plus faible quantité, par les macrophages, les fibroblastes et les monocytes infiltrants (Hernandez-Gea et Friedman, 2011). Les voies de signalisation des différentes cytokines sont représentées dans la Figure 17.

3.2.4.2 Les chimiokines

Les chimiokines sont une classe de petites molécules chimiotactiques avec des fonctions de type cytokine, qui sont bien connues pour être impliquées dans les réponses inflammatoires au sein de différents organes. Les différentes cellules effectrices de la fibrose hépatique sont des cibles et des sources potentielles de chimiokines, chacune exprimant une combinaison différente de récepteurs et de ligands. Les HSCs expriment plusieurs récepteurs dont CXCR3, CCR5 et CCR7 et sécrètent de nombreuses chimiokines, telles que le peptide chimiotactique monocyttaire MCP-1/CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1, CXCL8, CXCL9 et CXCL10. Ces chimiokines favorisent la migration des cellules fibrogéniques vers le site de la lésion, notamment, CCR5, dont le ligand, RANTES, est induit par la signalisation NF κ B, qui stimule la migration et la prolifération des HSCs (Lee and Friedman, 2011).

3.2.4.3 Les interactions immunitaires

En plus des cellules décrites précédemment, d'autres types de cellules sont impliqués dans la progression et la résolution de la fibrose y compris les cellules tueuses naturelles (NK), les cellules T et les cellules dendritiques. Les HSCs interagissent directement avec les diverses cellules immunitaires *via* les molécules d'adhérence, notamment la molécule d'adhérence

intercellulaire 1 (ICAM-1) et la molécule d'adhérence de cellules vasculaires 1 (VCAM-1) dont l'expression est augmentée dans les HSCs activées facilitant le recrutement de cellules inflammatoires dans le foie lésé (Lee and Friedman, 2011).

3.2.4.4 Les régulations épigénétiques

Un rôle potentiel des modifications épigénétiques (modification des histones, méthylation de l'ADN et inhibition par les ARN non codants) dans l'activation des HSCs, la prolifération cellulaire et la transcription des gènes tels que le α -SMA et le collagène de type I, a également été décrit dans la littérature (Figure 18) (Hernandez-Gea and Friedman, 2011).

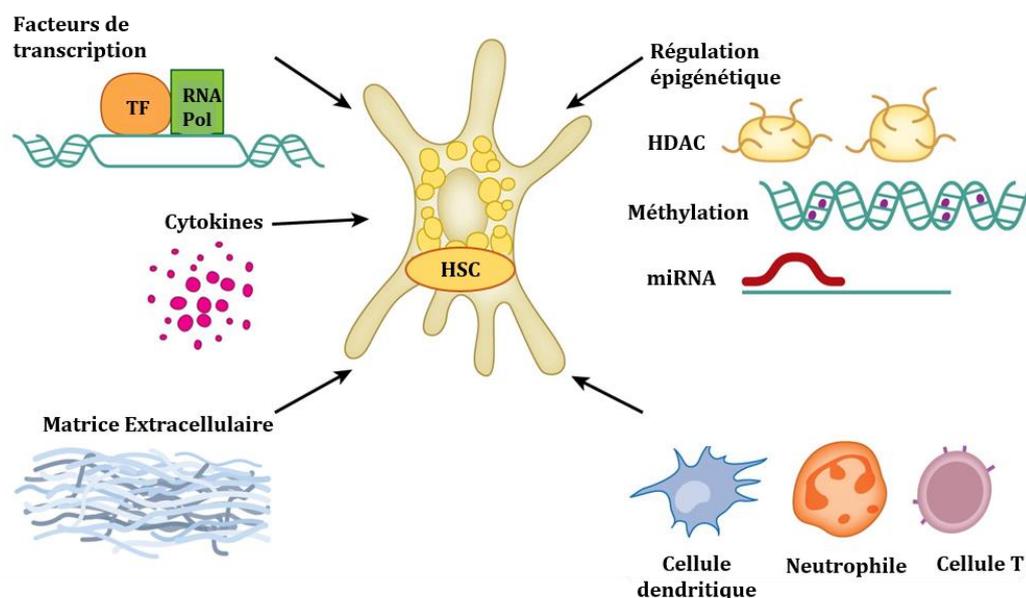


Figure 18 : Régulation de l'expression des gènes dans les HSCs pendant la fibrose.

Les facteurs de transcription (FT) peuvent favoriser ou bloquer le recrutement et la liaison de l'ARN polymérase (ARN pol) à une séquence d'ADN spécifique et ainsi contrôler le taux d'expression des gènes. Des changements dans l'expression des gènes peuvent également se produire sans modification des séquences d'ADN *via* au moins trois processus épigénétiques distincts : la désacétylation des histones (HDAC), la méthylation de l'ADN et l'extinction de l'expression par des microARN non codants (miRNA). L'activation des cellules immunitaires à la suite d'une lésion hépatique est également un stimulus important pour l'activation des HSCs qui se produit principalement par la sécrétion de molécules pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques. Les cytokines et les composants de la MEC jouent également un rôle important dans l'initiation de la fibrose et la perpétuation de l'activation des HSCs. Image adaptée de (Hernandez-Gea and Friedman, 2011).

3.2.4.5 Les récepteurs nucléaires

Les HSCs expriment un groupe de récepteurs nucléaires, jouant le rôle de facteurs de transcription, notamment les récepteurs RXR et RAR sensibles aux rétinoïdes, le récepteur Farnésoloïde X (FXR), qui régule la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse et le transport des acides biliaires et du cholestérol et les récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs des peroxysomes (PPAR), qui sont des régulateurs clés du métabolisme du glucose et des graisses. Ils sont associés, pour la plupart d'entre eux, au maintien de la quiescence des cellules stellaires. PPAR- γ est fortement exprimé par les HSCs quiescentes

où il renforce leur phénotype adipogène. Il a été décrit que son expression diminue lors de l'activation des HSCs, ce qui est crucial pour permettre la transdifférenciation vers un phénotype myo-fibroblastique (Bansal et al., 2016; Mann and Mann, 2009).

3.2.4.6 Les voies neuroendocrines

En cas de lésion hépatique chronique, le système neuroendocrinien local est régulé à la hausse, et les HSCs activées expriment des récepteurs spécifiques, principalement ceux impliqués dans la signalisation des cannabinoïdes endogènes. Ces derniers sont une famille de molécules dérivées de l'acide arachidonique qui activent des voies de signalisation à travers les récepteurs CB1 et CB2. La fibrose hépatique est associée à une surexpression des endocannabinoïdes et de leurs récepteurs (Hernandez-Gea and Friedman, 2011; Lee and Friedman, 2011).

3.2.5 Remodelage de la MEC

En réponse aux cytokines inflammatoires, les HSCs activées vont commencer à sécréter les enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice, notamment les MMP-2, 3, 9, et 13. Ces 4 types de MMPs ainsi que MMP-10 ont été décrits comme étant surexprimés dans un modèle de fibrose induite par le CCl₄ chez le rat. De plus, une surexpression de MMP-2 et MMP-14 a été mise en évidence dans les HSCs activées *in vitro*. Ces deux types de MMPs, favoriseraient la migration, la prolifération et l'activation des HSCs (Roderfeld, 2018).

Parmi les quatre inhibiteurs spécifiques de MMPs identifiés, TIMP-1 est considéré comme l'inhibiteur le plus puissant. Durant la fibrose hépatique, TIMP-1 est surexprimé dans les HSCs activées en réponse aux différentes cytokines empêchant la dégradation de la MEC par les MMPs (Cong et al., 2013).

Comme décrit dans le paragraphe 1.5 de ce chapitre, la MEC sert également de réservoir pour de multiples cytokines et facteurs de croissance solubles qui sont généralement liés à des composants spécifiques de la MEC *via* des interactions non covalentes de faible affinité. La décorine et le biglycane sont capables de lier le TGF- β , la laminine et la fibronectine lient le TNF- α , tandis que le collagène lie le PDGF, le HGF et l'IL-2 (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Lors d'une lésion hépatique, ces facteurs guident, par exemple, les cellules inflammatoires mais aussi les myofibroblastes vers le site cible de l'inflammation, entraînant une production excessive de MEC. La plupart de ces interactions sont schématisées dans la Figure 19 et soulignent que la MEC est un site de stockage clé pour de nombreuses molécules de signalisation impliquées dans la fibrose (Karsdal et al., 2015).

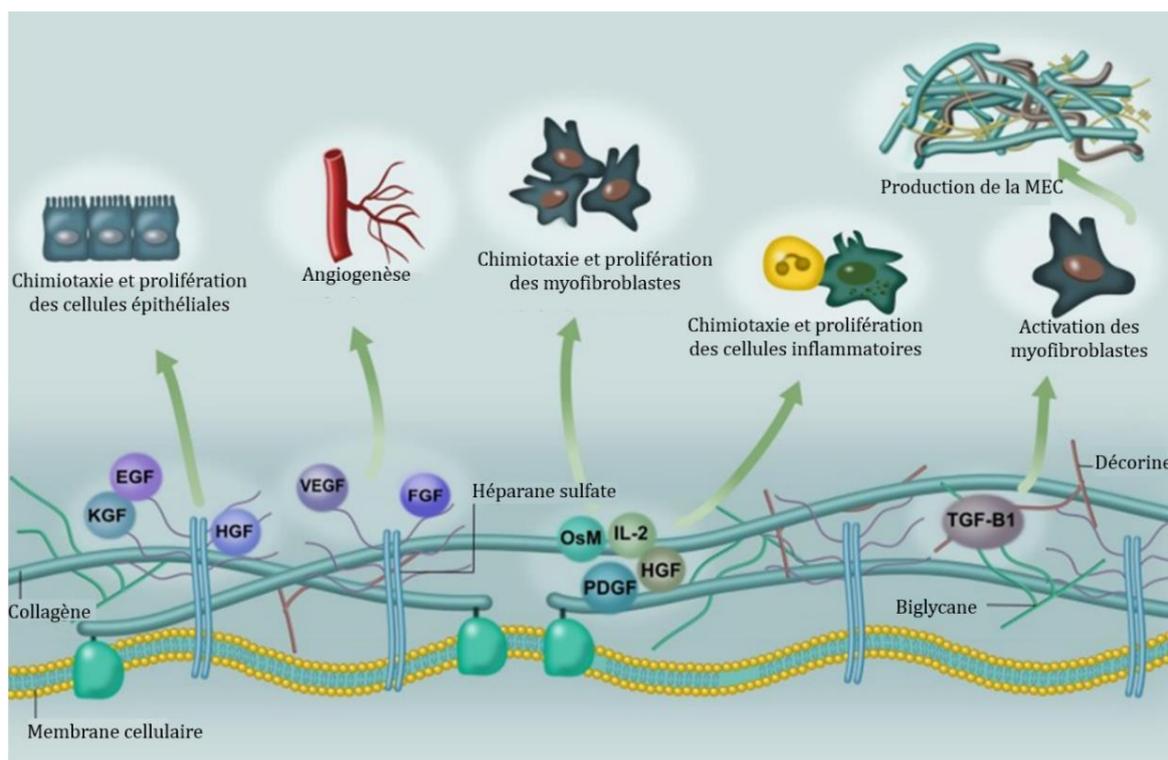


Figure 19 : Liaison de certains facteurs de croissance et cytokines à la MEC.

Interactions entre les facteurs de croissance ou cytokines inflammatoires et la MEC, et leur association avec l'héparane sulfate ou le collagène ainsi que leurs cellules cibles. La libération de facteurs de croissance et de cytokines biologiquement actifs stockés dans la MEC peut déclencher le recrutement et la prolifération des cellules inflammatoires et favoriser un dépôt excessif de la MEC par des myofibroblastes (comme c'est le cas avec le TGF- β 1 lié à la décorine/biglycane). (Abréviations : OsM, oncostatine-M). Image adaptée de (Karsdal et al., 2015).

Au cours de la fibrose hépatique, les collagènes de type 1 et 3 représentent les deux composants les plus abondants de la MEC. Il a été décrit que les cytokines pro-fibrogéniques notamment IL-4/IL-13 et TGF- β induisent l'augmentation de leur expression dans un foie fibrotique, notamment *via* les 2 voies de signalisation SMAD et p38 MAPK (Bhagal et al., 2005; Refaat et al., 2016; Tsukada et al., 2005). Une augmentation de l'expression du collagène de type XV alpha 1 a également été démontrée dans le foie de rats des deux modèles de fibrose BDL et CCl₄ et sur des biopsies hépatiques de patients atteints de fibrose avancée ou de cirrhose (Lemoine et al., 2015).

La dédifférenciation des cellules stellaires est la principale source cellulaire de myofibroblastes sécrétant des protéines matricielles au cours de la fibrogénèse hépatique. Les signaux paracrines des cellules épithéliales lésées (ROS, cytokines, chimiokines) ainsi que les interactions avec les cellules immunitaires peuvent induire l'activation des HSCs, de manière directe ou indirecte. La signalisation intracellulaire dérégulée, les changements épigénétiques et la réponse au stress cellulaire représentent des voies cibles pour inhiber les HSCs en induisant l'inversion phénotypique, la sénescence cellulaire, l'apoptose, et / ou l'élimination par les cellules immunitaires (voir Chapitre 2, 2.4 Elimination des HSCs activées, page 91).

3.3 Les différents marqueurs des HSCs

3.3.1 La desmine

La desmine, un filament intermédiaire typique des cellules contractiles, est largement utilisée comme «un marqueur clé» pour identifier les HSCs dans le foie, depuis sa découverte en 1984 (Yokoi et al., 1984). Cette protéine est décrite comme étant exprimée à la fois par les cellules stellaires quiescentes et après leur dédifférenciation en myofibroblastes (Friedman, 2008a).

3.3.2 La GFAP

D'autres marqueurs permettent d'identifier les cellules stellaires, notamment la protéine acide fibrillaire gliale (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP), qui est une protéine constitutive des filaments intermédiaires, initialement découverte dans les astrocytes du système nerveux central. Les HSCs sont les seules cellules du foie exprimant la GFAP, celle-ci est colocalisée avec la desmine dans les HSCs quiescentes. Chez le rat, l'expression de la GFAP diminue en au cours de la fibrose hépatique, comme cela a été démontré dans un modèle de fibrose induite par le CCl₄ (Niki et al., 1996).

3.3.3 Le cRBP1

Un autre marqueur des cellules stellaires est la protéine cellulaire de liaison au rétinol (*cellular retinol binding protein*, cRBP1) impliquée dans le métabolisme de la vitamine A. Dans un foie sain, les HSCs quiescentes expriment cRBP1. Dans un modèle de fibrose induite par le CCl₄ chez le rat, les HSCs activées présentent toujours une forte expression du cRBP1. De plus, lors de la transformation *in vitro* des HSCs en myofibroblastes, ces dernières continuent à exprimer le cRBP1 (Uchio et al., 2002).

3.3.4 La synaptophysine

La synaptophysine (SYN) est une glycoprotéine membranaire impliquée dans l'exocytose des neurotransmetteurs et un marqueur neuroendocrinien. Cette protéine a été identifiée comme étant exprimée par les HSCs sur des biopsies hépatiques humaines (conditions normales et pathologiques) mais également par les HSCs de rats atteints d'hépatite ou de cirrhose hépatique induite par le CCl₄. Il a ainsi été démontré que la SYN pouvait être utilisée comme un nouveau marqueur pour les HSCs quiescentes et activées (Cassiman et al., 1999). Des chercheurs l'ont utilisée pour différencier les fibroblastes portaux des HSCs dans des foies fibrotiques humains, de rat et de souris (Iwaisako et al., 2014). Dans une autre étude, réalisée sur des rats atteints de NAFLD induite par un régime HF, une augmentation de l'expression de la SYN a été observée dans le foie ainsi qu'une diminution de son expression après intervention thérapeutique (Xiao et al., 2014).

3.3.5 Le récepteur à l'IGF-IIR (*insulin-like growth factor*)

Le récepteur à l'IGF-II (*insulin-like growth factor*), également connu sous le nom de récepteur au mannose-6-phosphate (M6P-R), fait partie de la voie de signalisation à l'IGF. Il est impliqué dans la régulation de l'activité de l'IGF-II, et dans le transport des protéines possédant une "étiquette" M6P vers les lysosomes où elles sont dégradées. Ce récepteur n'est pas lié à l'activité tyrosine kinase ni à la prolifération et semblerait être impliqué dans l'activation du TGF- β . L'IGF-IIR est 20 fois plus exprimé dans les HSCs activées que dans les HSCs quiescentes (Beljaars et al., 1999). Son expression est souvent corrélée aux lésions hépatiques chroniques (Hellemans et al., 2004). De plus, l'internalisation modulée par l'IGF-IIR, dans les HSCs activées, est 3 fois plus rapide que l'endocytose cellulaire qui ne fait pas intervenir des récepteurs membranaires (York et al., 1999).

3.3.6 Le α -SMA (α -Smooth Muscle Actin)

La transformation des cellules stellaires en myofibroblastes s'accompagne de l'expression de l'actine α du muscle lisse (*α -Smooth Muscle Actin*, α -SMA), caractéristique des cellules musculaires lisses vasculaires, des myofibroblastes ou des fibroblastes contractiles. C'est l'une des six isoformes d'actine exprimées dans les tissus des mammifères ; elle est localisée dans des faisceaux de microfilaments et joue un rôle dans la différenciation et la maturation des myofibroblastes. Cette protéine est également impliquée dans la génération des propriétés contractiles de ces cellules. L'expression de α -SMA est considérée comme le marqueur le plus fiable de la présence de myofibroblastes ou de HSCs activées car il est absent des autres cellules hépatiques résidentes dans le foie sain ou lésé, à l'exception des cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux. Il reflète donc la présence des myofibroblastes responsables de la fibrose. Ce marqueur est utilisé quel que soit le type de fibrose étudié (pulmonaire, rénale, hépatique...) (Friedman, 2008a).

3.4 Les rétinoïdes

Le rétinol peut également être utilisé comme un marqueur spécifique des HSCs car ce sont les seules cellules responsables de son stockage dans le foie.

3.4.1 Mise en réserve et mobilisation du rétinol

La vitamine A, essentielle à la croissance et à la différenciation de plusieurs cellules, est stockée dans le foie puis sécrétée vers les tissus cibles (reins, yeux...). Dans l'organisme, elle est présente sous quatre formes de rétinoïdes : (1) le rétinol, la forme majeure de transport ; (2) les esters de rétinyle, la forme de stockage ; (3) l'acide rétinoïque, le métabolite actif majeur

de la vitamine A, issu de l'oxydation du rétinol ; et enfin (4) le rétinol, le métabolite intermédiaire lors de la formation de l'acide rétinoïque à partir du rétinol (Johnson, 1994).

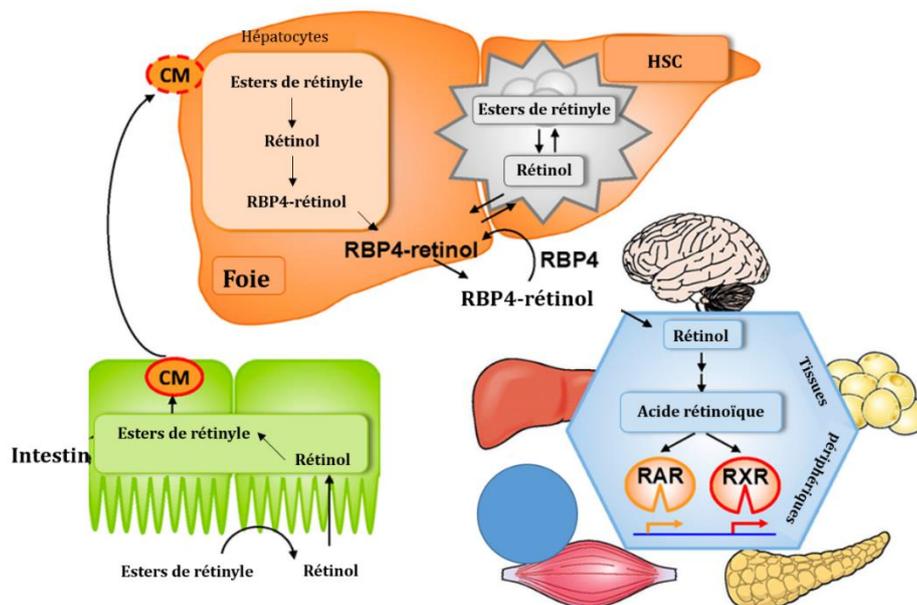


Figure 20 : Représentation schématique de l'absorption, du transport, du stockage de la vitamine A dans le foie et de la redistribution aux tissus périphériques.

Les esters de rétinyle sont les principales sources alimentaires de vitamine A. Ils sont absorbés dans l'intestin et transportés sous forme d'esters de rétinyle *via* les chylomicrons (CM) vers le foie. Les esters de rétinyle sont hydrolysés pour former du rétinol. Les hépatocytes produisent la protéine de liaison au rétinol 4 (RBP4) qui transporte le rétinol dans la circulation. Le rétinol est ensuite soit transporté vers les HSCs pour être stocké sous forme d'esters de rétinyle, soit transporté vers les tissus périphériques où il est converti en acides rétinoïques qui activent les facteurs de transcription (récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) ou récepteur du rétinol X (RXR)). En cas d'apport insuffisant en vitamine A, le rétinol est libéré des HSCs pour maintenir des niveaux stables de rétinol circulant ($\sim 2 \mu\text{M}$ chez l'humain). Image adaptée de (Saeed et al., 2018).

Le rétinol alimentaire est absorbé par les entérocytes où il est estérifié avec des acides gras puis transporté par les chylomicrons vers les hépatocytes *via* la circulation lymphatique mésentérique. Parvenu aux hépatocytes, cet ester de rétinyle est hydrolysé en rétinol puis lié à des protéines de liaison au rétinol (*retinol-binding protein*, RBP) permettant le transfert du rétinol aux HSCs. Une petite quantité reste dans les hépatocytes. En parallèle, les HSCs peuvent également absorber les rétinolides liés aux RBPs directement depuis la circulation sanguine. Dans le cytosol des HSCs, le rétinol est rapidement lié au cRBP1 puis ré-estérifié et stocké sous forme d'ester de rétinyle. L'ester de rétinyle majoritairement présent dans les HSCs est le palmitate de rétinyle (Friedman, 2008a). Le stockage et le transport des rétinolides sont influencés par le statut en vitamine A. En cas de carence en vitamine A, l'ester de rétinyle est hydrolysé, au niveau des HSCs, en rétinol qui retourne vers les hépatocytes pour être complexé aux RBPs, puis sécrété dans la circulation sanguine (Yamamoto et al., 2003). La libération directe dans le plasma de rétinol lié aux RBPs à partir des HSCs peut également se produire. De plus, en cas de déficience en vitamine A, les rétinolides provenant de l'alimentation et transportés vers le foie sont rapidement liés aux RBPs dans les hépatocytes,

et exportés vers la circulation sans transfert vers les HSCs (Friedman, 2008a). Les RBPs sont considérées comme des transporteurs plasmatiques du rétinol, facilitant son transfert entre les tissus, principalement des sites de stockage vers les tissus périphériques (Figure 20). À jeun, plus de 95% des rétinoïdes dans la circulation se trouvent sous forme de rétinol lié aux RBPs. Le reste des rétinoïdes dans la circulation peut être sous forme d'esters de rétinyle associés aux lipoprotéines (VLDL, LDL et HDL) ou d'acide rétinoïque lié à l'albumine (D'Ambrosio et al., 2011a).

Dans les tissus cibles, le rétinol est oxydé pour former le métabolite actif : l'acide rétinoïque, qui se lie à des récepteurs nucléaires, les RAR (*retinoic acid nuclear receptors*) et les RXR (*retinoid X receptors*), modulant l'expression de plusieurs gènes comme par exemple les gènes de la différenciation tissulaire lors de l'embryogenèse.

3.4.2 Utilisation du rétinol comme marqueur des HSCs

Le rétinol possède des propriétés d'auto-fluorescence, ce qui offre la possibilité de l'utiliser pour identifier et visualiser les cellules stellaires, sans traitement particulier (Friedman, 2008a). Les propriétés d'auto-fluorescence du rétinol ont notamment été utilisées pour améliorer la purification des HSCs à partir d'une suspension cellulaire issue d'une digestion du foie de souris (Mederacke et al., 2015). Le nombre de gouttelettes de rétinol varie selon l'espèce et l'abondance des réserves de vitamine A dans l'organisme. Les gouttelettes de vitamine A dans les HSCs présentent un schéma hétérogène et des tailles variables en fonction de la position intra-lobulaire des cellules. La fluorescence du rétinol est plus concentrée dans les régions péri-portales que dans les régions péri-centrales. Une caractéristique bien connue des animaux arctiques, en particulier des ours polaires, des phoques et des renards arctiques, est la forte concentration en vitamine A hépatique, de sorte que les premiers explorateurs qui ont mangé du foie d'ours polaire non cuit souffraient d'un syndrome d'hypervitaminose A, qui se caractérise par de graves lésions hépatiques (Nolleaux et al., 2006; Senoo et al., 2007). Cependant, il n'y a pas de caractéristiques distinctes de ces mammifères arctiques identifiées à ce jour qui différencient leurs voies de stockage de la vitamine A de celles des humains. La raison pour laquelle ces animaux sont protégés de la toxicité hépatique due à la vitamine A n'est pas claire (Friedman, 2008a).

Les gouttelettes de rétinoïdes sont constituées d'environ 40% d'ester de rétinyle tandis que les 60% restants sont des espèces lipidiques non-rétinoïdes, comme les triglycérides, les esters de cholestérol, le cholestérol, les phospholipides et les acides gras libres. Il a été suggéré que la formation et le maintien de ces gouttelettes lipidiques sont des processus dépendants des rétinoïdes (D'Ambrosio et al., 2011b). En effet, l'apport alimentaire en rétinoïdes, mais pas en triglycérides, régule la composition lipidique des gouttelettes, mais

également le nombre et la taille de ces dernières (Blaner et al., 2009; Moriwaki et al., 1988). L'enzyme LRAT ou *Lecithin-retinol acyltransferase*, responsable de la synthèse des esters de rétinyle dans le foie, semble être nécessaire pour la formation de gouttelettes lipidiques dans les HSCs. En effet, les cellules stellaires des souris déficientes en LRAT sont dépourvues de gouttelettes lipidiques (Blaner et al., 2009).

L'une des caractéristiques phénotypiques de l'activation des HSCs est la perte de gouttelettes de rétinol (Figure 21). Dans des HSCs en culture, l'ester de rétinyle stocké dans les gouttelettes lipidiques est d'abord hydrolysé puis libéré dans le milieu sous forme de rétinol (D'Ambrosio et al., 2011b). Cependant, le rôle des rétinol dans les HSCs quiescentes reste inconnu. On ne sait pas non plus si la perte de rétinol est nécessaire pour l'activation des HSCs, ni s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de l'activation (D'Ambrosio et al., 2011b; O'Mahony et al., 2015). De plus, il a été récemment démontré que les changements dans l'expression des gènes qui accompagnent l'activation des HSCs et la perte des gouttelettes de rétinol sont régulés différemment dans les modèles d'activation *in vitro* et *in vivo* (De Minicis et al., 2007).

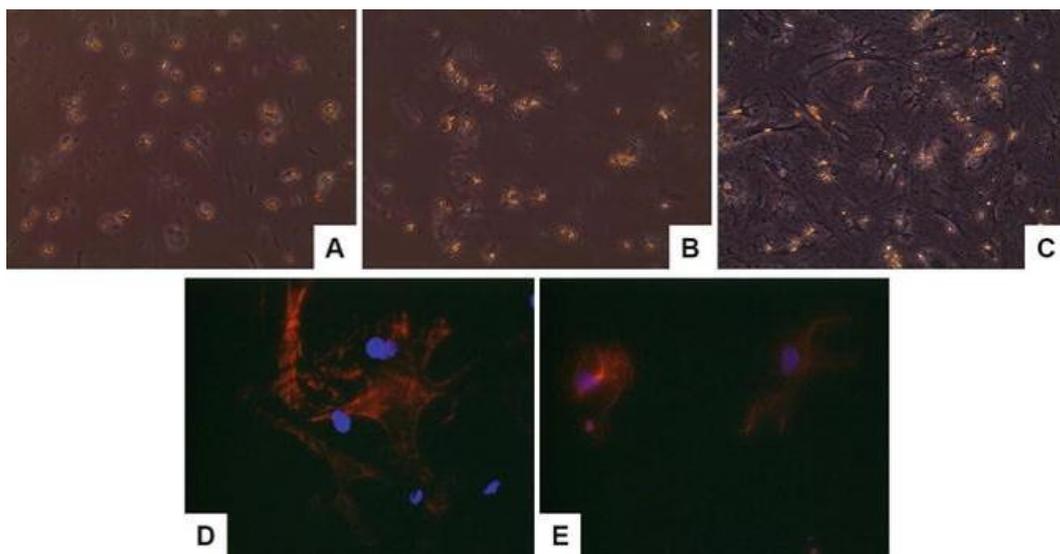


Figure 21 : Activation et transdifférenciation des HSCs primaires en culture.

Des HSCs isolées ont été cultivées sur un support plastique non revêtu pendant (a) 1 jour, (b) 2 jours ou (c) 5 jours. Pendant la culture, la teneur en vitamine A diminue et les cellules acquièrent un phénotype typique en forme étirée. (d) Les HSCs ont été colorées avec un conjugué de rhodamine phalloïdine (rouge) et une contre-coloration au DAPI (bleu). (e) Immunocytochimie des HSCs, desmine (rouge). Image issue de (Weiskirchen et al., 2017).

4. Modèles de fibrose

4.1 Modèles *in vivo* de fibrose hépatique

L'utilisation de modèles animaux est cruciale pour déterminer les mécanismes sous-jacents à l'initiation, la progression et la résolution de la fibrose mais également pour développer de nouvelles thérapies anti-fibrotiques. À ce jour, aucun modèle animal ne peut récapituler toutes les caractéristiques physiopathologiques hépatiques et extra-hépatiques de la fibrose. Ici, nous nous concentrons sur les modèles de maladies hépatiques les plus utilisés chez les rongeurs.

4.1.1 Modèles chirurgicaux

Le modèle de ligature des voies biliaires (*bile-duct ligation*, BDL), basé sur la double ligature du canal biliaire, est le modèle chirurgical le plus courant ; il induit une fibrose biliaire péri-portale et des lésions cholestatiques (Aydın and Akçalı, 2018). Ce modèle a d'abord été établi chez le rat et a ensuite été appliqué à la souris (Yanguas et al., 2016). L'obstruction des voies biliaires entraîne une pression biliaire accrue et une accumulation d'acides biliaires induisant une toxicité dans les hépatocytes et les cellules épithéliales biliaires, ainsi qu'une accumulation de lymphocytes B et T dans les voies portales. Une inflammation se met donc en place, avec la sécrétion de cytokines telles que le TGF- β , en particulier par les cellules épithéliales biliaires (Yanguas et al., 2016). Cette inflammation entraîne une fibrose et une cholestase (ou diminution de la sécrétion biliaire). En plus des cellules stellaires, les fibroblastes portaux semblent être impliqués dans la fibrose portale et représentent une source importante de myofibroblastes dans le modèle BDL (Yanguas et al., 2016). La reproductibilité de ce modèle est faible du fait d'un taux de mortalité élevé (20%), 5 à 6 semaines après la ligature de la voie biliaire chez le rat (Yanguas et al., 2016). Ce modèle a donc été suggéré pour une utilisation dans les études de fibrose hépatique à court terme associées à la cholestase (Aydın and Akçalı, 2018).

4.1.2 Modèles chimiques

4.1.2.1 Tétrachlorure de carbone (CCl₄)

Le modèle hépatotoxique induit par administration de tétrachlorure de carbone (CCl₄) est le plus largement utilisé dans les études sur la fibrose hépatique et la cirrhose chez les rongeurs (Aydın and Akçalı, 2018). Il consiste à injecter une solution de CCl₄ aux animaux, de manière chronique. Cette molécule induit des dommages hépatiques sévères : une nécrose hépatocellulaire, un recrutement des cellules inflammatoires dès les premiers jours de traitement et une fibrose hépatique au bout de quatre semaines (Docherty and Burgess, 1922;

Li et al., 2015b). Ce modèle peut être appliqué au rat et à la souris. Cependant, la sensibilité des souris à la fibrose hépatique induite par le CCl₄ dépend de la souche. Ainsi, les souris balb/c présentent plus de fibrose lors de l'administration de CCl₄ que les souris C57BL/6. Le CCl₄ est généralement administré aux rongeurs par voie intrapéritonéale. D'autres voies peuvent également être utilisées comme la voie sous-cutanée, orale ou par inhalation. Bien que le modèle d'induction de fibrose par le CCl₄ soit un modèle rapide et sévère, il entraîne des dommages hépatiques toxiques et est alors peu représentatif des maladies métaboliques du foie, qui ont une évolution plus lente et progressive (Aydın and Akçali, 2018; Yanguas et al., 2016).

4.1.2.2 Ethanol

Puisque la consommation d'alcool est l'une des plus grandes causes de maladies chroniques du foie dans le monde, le modèle d'administration d'éthanol aux animaux a été testé. L'administration d'éthanol induit la production de ROS et la peroxydation lipidique conduisant à l'apoptose des hépatocytes et à l'inflammation. Cependant, une des limites de ce modèle est la faible appétence pour l'alcool des animaux, ce qui limite leur consommation spontanée. De plus, ce modèle n'induit pas de fibrose hépatique (Aydın and Akçali, 2018; Yanguas et al., 2016).

4.1.2.3 Thioacétamide

La thioacétamide est une molécule chimique qui nécessite une activation métabolique par les isoenzymes du CYP450 pour devenir toxique. Le métabolite toxique serait impliqué dans la régulation négative des enzymes de la β -oxydation des acides gras et de la dégradation de la méthionine. Il semble également induire une régulation positive des protéines liées à la peroxydation lipidique et au stress oxydatif. Par conséquent, l'administration de thioacétamide entraîne des dommages oxydatifs élevés, associés à l'activation des HSCs, et une légère infiltration de cellules inflammatoires. Une hypertrophie du foie, une nécrose centro-lobulaire et une élévation du taux sérique des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT) sont également observées. En règle générale, la thioacétamide est administrée par voie intrapéritonéale pendant une période comprise entre 8 et 12 semaines, ou par voie orale, pendant 16 semaines (Aydın and Akçali, 2018; Yanguas et al., 2016).

4.1.2.4 DMN et DEN

La diméthylnitrosamine (DMN) et la diéthylnitrosamine (DEN) sont deux produits chimiques cancérigènes, souvent utilisés pour générer une fibrose hépatique chez les animaux. La biotransformation de ces produits génère des ROS, qui à leur tour vont réagir avec les acides nucléiques, les lipides et les protéines, entraînant un dysfonctionnement cellulaire et une

nécrose suivis d'une fibrose. La DEN est systématiquement administrée par voie orale pendant 12 semaines ou par voie intrapéritonéale pendant 2 semaines. La DMN est administrée par voie intrapéritonéale aux souris pendant 3 semaines (Aydın and Akçalı, 2018; Yanguas et al., 2016).

4.1.3 Modèles génétiques

Les modèles génétiques sont souvent utilisés pour étudier l'implication de certaines voies de signalisation dans la génération de la fibrose hépatique, ou la conséquence de leur dérégulation, permettant ainsi l'étude de nouvelles cibles. Un exemple de ces modèles génétiques est le modèle de souris déficientes en *Mdr2*, qui est un orthologue de souris du gène humain *MDR3* (*ABCB4*), codant le transporteur phospholipidique canaliculaire. La perturbation génétique du gène *Mdr2* chez la souris provoque une absence totale de phosphatidylcholine dans la bile, entraînant différentes lésions hépatiques. Ainsi les souris *Mdr2* *-/-* présentent un niveau élevé de nécrose hépatocytaire et d'inflammation portale, ainsi qu'une fibrose hépatique. Elles sont capables de développer une fibrose biliaire à 4-8 semaines et un CHC à 4-6 mois (Aydın and Akçalı, 2018; Ikenaga et al., 2015).

Parmi les modèles génétiques, on trouve également le modèle de carence en leptine (souris *ob/ob*). La leptine est une hormone peptidique sécrétée principalement par les adipocytes du tissu adipeux blanc, qui joue un rôle vital dans la régulation de l'équilibre énergétique. Lorsqu'elle est absente, la graisse est redistribuée du tissu adipeux vers le foie et d'autres tissus non adipeux. L'accumulation de graisse dans le foie induit une lipotoxicité des hépatocytes ainsi qu'une apoptose. Les souris *ob/ob* présentent facilement une résistance sévère à l'insuline, mais ne développent pas de fibrose même en d'un stimulus supplémentaire comme un régime MCD. En revanche, les souris du modèle *db/db* qui présente un défaut du gène *db* codant un des récepteurs de la leptine peuvent développer une fibrose en présence d'un stimulus supplémentaire (LPS, régime gras, MCD, etc.) (Sahai et al., 2004).

En effet, il est toujours difficile de développer une fibrose hépatique chez les animaux génétiquement modifiés sans un deuxième stimulus (Aydın and Akçalı, 2018). Pour cela, l'ajout de régimes spécifiques est souvent nécessaire pour induire les changements biochimiques de la NASH (Santhekadur et al., 2018).

4.1.4 Modèles métaboliques

4.1.4.1 Methionine Choline Deficient (MCD)

Le modèle alimentaire déficient en méthionine et en choline (*Methionine Choline Deficient*, MCD) est le modèle le plus utilisé pour étudier la stéatohépatite. C'est un modèle rapide qui induit une stéatose hépatique principalement macro-vésiculaire, dès les premiers jours, une

stéato-hépatite après 10 jours de régime, qui évolue en fibrose péri-sinusoïdale au bout de 8 à 10 semaines, chez le rat et la souris (Santhekadur et al., 2018; Takahashi, 2012). La méthionine la choline sont deux éléments très importants d'un point de vue nutritionnel, et entrent dans la voie de mobilisation des triglycérides intra-hépatiques. La méthionine est un acide aminé essentiel, précurseur de la biosynthèse de choline. La déficience en choline empêche la synthèse de phosphatidylcholine (PC), qui joue un rôle dans la sécrétion des VLDL contenant les triglycérides. Une diminution de la PC provoque donc l'accumulation intrahépatique des triglycérides (Noga and Vance, 2003). Ce régime imite le stress hépatique causé par la transition d'acides gras du tissu adipeux vers le tissu hépatique, ainsi que la production accrue de triglycérides, entraînant une stéatose hépatique et une lipotoxicité (Yanguas et al., 2016). En réponse aux lésions hépatocytaires, les cellules de Kupffer activées augmentent leur production de TNF- α , ce qui induit le recrutement de monocytes. De nombreux foyers nécro-inflammatoires contenant des lymphocytes et des neutrophiles, une inflammation, un stress oxydatif, des dommages mitochondriaux et une apoptose sont observés. Les HSCs s'activent, ce qui oriente la pathologie vers une fibrose. Le taux sérique d'ALAT est également augmenté (Takahashi, 2012). Bien que le modèle MCD reproduise le phénotype histologique de la NASH sur une période relativement courte, il n'imites pas complètement la pathologie humaine (Santhekadur et al., 2018). En effet, certaines caractéristiques pathologiques humaines des NAFLD, dont l'obésité et l'insulino-résistance ne sont pas retrouvées chez les animaux soumis au régime MCD. On observe même une perte de poids importante (souvent, plus de 20% après 3 semaines de régime), liée à la perte de la masse grasse mais également musculaire (Ramadori et al., 2015). Le degré de NASH chez les rongeurs soumis au régime MCD peut dépendre de l'espèce, du sexe et de la souche de l'animal. Ainsi, les souris mâles C57BL/6 développent plus d'inflammation et de nécrose, et présentent plus de caractéristiques histologiques de la NASH que d'autres souches (Takahashi, 2012).

4.1.4.2 High-Fat Diet (HFD)

Un autre modèle de maladie hépatique métabolique décrit dans la littérature est le modèle alimentaire hyper-lipidémique (*High-Fat Diet*, HFD). Il est composé de 71% de matières grasses, contre 10% pour un régime standard. Il provoque une prise de poids importante chez les animaux et induit une stéatose hépatique, accompagnée d'une inflammation, d'insulino-résistance et de diabète. Les animaux soumis à ce régime développent une NASH, après un temps long, autour de 16 semaines, et dont le degré de gravité est peu avancé. La fibrose hépatique n'est pas systématiquement induite, ou peut être très lente à se mettre en place, puisque ce modèle nécessite 50 semaines pour voir se développer une fibrose bénigne chez la souris, avec une grande variabilité interindividuelle, ce qui limite son utilisation (Aydın and

Akçali, 2018; Charlton et al., 2011; Santhekadur et al., 2018; Yanguas et al., 2016). Les souris mâles consanguines C57BL/6 sont les rongeurs les plus appropriés pour développer une NASH en utilisant un régime HF, tandis que les rats ne répondent pas à ce régime. Un autre régime HF, riche en cholestérol, a été proposé pour le rat. Il induit une NASH avec une fibrose en 9 semaines, les rats développent parfois une cirrhose. Néanmoins, le principal inconvénient de ce modèle est le manque d'obésité et de résistance à l'insuline (Yanguas et al., 2016).

4.1.4.3 High Fat High Carbohydrate (HFHC)

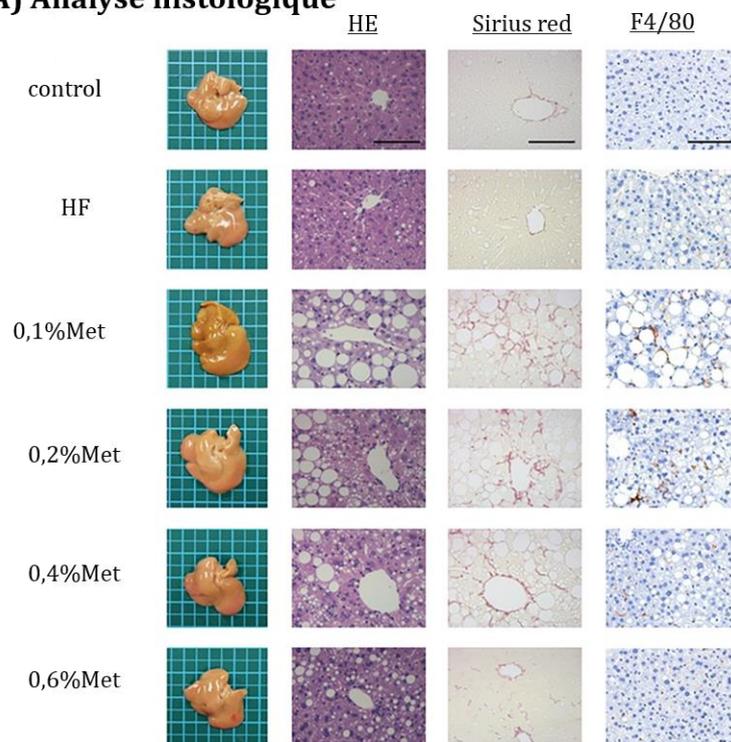
En 2010, l'équipe de Kohli a développé un nouveau modèle de NASH. Ce dernier consiste à soumettre les souris à un régime alimentaire associant l'hyperlipidémie et un apport élevé en sucre, (*High Fat High Carbohydrate*, HFHC) en ajoutant du fructose dans l'eau de boisson de souris soumises à un régime hyperlipidémique (HFD). Il s'agit d'un régime de type « Western Diet » qui mime l'alimentation trop grasse et trop sucrée consommée dans les pays développés (Lustig et al., 2012). Ce régime induit une prise de poids des animaux accompagnée d'une insulino-résistance. Il a été décrit que les souris soumises à ce régime développent une inflammation sévère ainsi qu'une stéatose hépatique. Cependant, une fibrose marquée a été observée chez seulement 50% des souris après 16 semaines de régime (Kohli et al., 2010). L'évolution de la pathologie dépend de l'âge des souris et des mécanismes différents ont été observés entre les mâles et les femelles (Marin et al., 2016).

4.1.4.4 Choline-Deficient L-amino acid-defined High-Fat Diet (CDAHFD)

Récemment, un modèle alimentaire associant une déficience en choline, supplémenté en méthionine (0,1%) et riche en lipides (*Choline-Deficient L-amino acid-defined High-Fat Diet*, CDAHFD) a été développé. Ce modèle induit une stéatose accompagnée d'une infiltration de cellules inflammatoires. Les souris soumises au régime CDAHFD présentent une fibrose légère dès la 9^{ème} semaine du régime. Ce modèle semble moins sévère pour les animaux que le régime MCD puisque les souris ne présentent pas de perte de poids trop importante. En effet, l'addition au régime alimentaire d'une faible quantité de méthionine semble limiter la perte de poids des animaux (Matsumoto et al., 2013). Une étude qui consistait à tester différentes concentrations en méthionine (de 0,1 à 0,6%) a montré qu'une NASH avec une fibrose légère est induite en 12 semaines, lorsque le régime comprend 0,2% de méthionine, sans provoquer de perte de poids. Une fibrose plus importante est observée pour 0,1% de méthionine, avec une légère perte de poids des animaux. Enfin, avec un régime contenant une concentration en méthionine supérieure à 0,4%, la NASH est absente (Chiba et al., 2016). Par conséquent, la concentration en méthionine, dans un régime CDAHFD, semble cruciale pour l'établissement de la NASH et de la fibrose (Figure 22). Bien que le régime CDAHFD augmente

la stéatose hépatique, il ne semble pas induire d'hypertrophie de la graisse viscérale, ni d'insulino-résistance périphérique (Matsumoto et al., 2013).

A) Analyse histologique



B) Score de fibrose

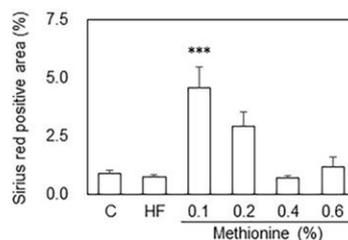


Figure 22 : Analyse histologique des coupes de foie de souris soumises au régime CDAHf.

(A) Cette figure illustre l'analyse histologique avec les colorations HE, Sirius Red et immunohistochimie du F4/80 (Macrophages), des coupes de foie de souris soumises (pendant 12 semaines) à un régime HFD ou HFD + 0,1%, 0,2%, 0,4% ou 0,6% de méthionine. (B) Le score de fibrose a été déterminé comme le rapport de la zone positive au Sirius Red sur la surface totale de la coupe. Image issue de (Chiba et al., 2016).

Au cours de ces 5 dernières années, près d'une trentaine d'études ont été réalisées en utilisant ce modèle, depuis son développement en 2013 par l'équipe de Matsumoto. Il a été démontré qu'après trois jours de régime CDAHf, les souris présentaient déjà des taux sériques d'ALAT et d'ASAT significativement élevés. Ces taux peuvent être augmentés par l'hyperglycémie induite par l'administration de streptozotocine parallèlement au régime (Harada et al., 2017). Ce modèle peut également être utilisé pour étudier l'apparition d'un hépatocarcinome, consécutif à une NAFLD et une NASH. En effet, au bout de 36 semaines de régime CDAHf, les souris développent un hépatocarcinome sans perte de poids importante associée, même après 60 semaines de régime (Ikawa-Yoshida et al., 2017). Une combinaison entre le régime

CDAHf et le modèle génétique de diabète de type 2, db/db, (présentant une mutation dans le gène codant un récepteur de la leptine) a également été étudiée. En plus de la stéatose hépatique, de l'inflammation et de la fibrose, ces souris ont développé une obésité et une hypercholestérolémie (Horas H Nababan et al., 2017). Ce régime a également été combiné avec le modèle toxique DEN sur des souris C57Bl/6. Après 24 semaines de régime, les souris présentaient un hépatocarcinome avec la formation d'importants nodules tumoraux (Li et al., 2019).

	Base mécanique	Avantages	Inconvénients
BDL	Augmentation de la pression biliaire Infiltration de cellules inflammatoires Génération de ROS Activation des fibroblastes portaux Induction d'une fibrose péri-portale et de lésions cholestatiques	Réversibilité après soulagement de l'obstruction Proche des lésions cholestatiques humaines	Taux de mortalité élevé Reproductibilité faible Variabilité entre les animaux
CCl₄	Biotransformation par le CYP2E1 en métabolites toxiques réactifs Nécrose hépatocellulaire Recrutement des cellules inflammatoires	Haute reproductibilité Développement rapide de la FH/cirrhose Imite les CLD associées à des dommages toxiques	L'administration ip peut induire une péritonite chronique L'administration sc peut induire une nécrose au site d'injection Modèle sévère, peu représentatif de la FH métabolique
Ethanol	Biotransformation par le CYP450 en métabolites toxiques réactifs Réponse immunitaire améliorée Synthèse accrue de collagène	/	Manque de capacité à développer une ALD en raison de la faible appétence pour l'alcool des animaux
TAC	Biotransformation par le CYP450 en métabolites réactifs Réponse immunologique	Peut être utilisé pour confirmer les résultats obtenus à partir d'autres modèles	Réversibilité lente
DMN/DEN	Biotransformation par le CYP2E1 en métabolites réactifs Génération de ROS et induction de nécrose	Bon modèle pour étudier le CHC	Pas idéal pour l'étude de la FH DMN/DEN : molécules cancérigènes
MCD	Lipotoxicité Apoptose des hépatocytes et libération des signaux de danger Activation des cellules de Kupffer et recrutement des monocytes Activation des HSCs	Suivi de la sévérité de la NASH fibrosante	Absence d'obésité et d'insulino-résistance périphérique Perte de poids importante
HFD	Prise de poids importante Induction d'une stéatose hépatique accompagnée d'une inflammation	Obésité et insulino-résistance périphérique	Très lent pour développer une FH légère chez la souris Pas de FH chez le rat Variabilité interindividuelle
HFHC	Associer l'hyperlipidémie et un apport élevé en sucre Prise de poids importante Induction d'une stéatose hépatique accompagnée d'une inflammation sévère	Insulino-résistance périphérique	Lent pour développer une FH Variabilité mâles/femelles Faible reproductibilité
CDAHFD	Induction d'une stéatose Infiltration de cellules inflammatoires Induction d'une FH Légère perte de poids	Imite les principales caractéristiques de la NASH humaine Reproductibilité importante FH métabolique marquée et relativement rapide	Le développement du CHC peut entraver l'étude de la FH Manque d'obésité, et d'insulino-résistance périphérique

Tableau 2 : Les principaux modèles *in vivo* de fibrose hépatique.

Abréviations : ALD, maladie hépatique alcoolique ; CLD, maladies chroniques du foie ; CYP, cytochrome P ; FH, fibrose hépatique ; CHC, carcinome hépatocellulaire ; ip, intrapéritonéale ; Sc, sous-cutanée ; TAC : thioacétamide. Adapté de (Yanguas et al., 2016).

Le Tableau 2 résume les principales caractéristiques des différents modèles *in vivo* de fibrose hépatique, ainsi que les avantages et les inconvénients de chaque modèle. La limite majeure des modèles de NASH induisant une fibrose marquée est l'absence d'obésité et d'insulino-résistance.

4.2 Modèles *in vitro* de fibrose hépatique

Outre les modèles animaux de fibrose hépatique, les modèles *in vitro* sont des outils précieux pour l'étude de l'activation des HSCs et de la fibrogénèse. Bien qu'ils ne puissent jamais mimer complètement la situation *in vivo*, ces modèles fournissent un système facile pour étudier les effets des composés pro- et anti-fibrotiques *in vitro*. Les cellules primaires et les lignées cellulaires sont les modèles les plus utilisés *in vitro* pour mimer ces processus complexes. Cependant, d'autres modèles existent basés sur différentes matrices ou encore sur des cocultures de différents types de cellules hépatiques, que nous ne détaillerons pas ici.

4.2.1 HSCs primaires

Plusieurs modèles d'activation des cellules stellaires, *in vitro*, ont été décrits dans la littérature. La première approche repose sur des HSCs primaires isolées d'un foie de souris ou de rat. Une fois mises en culture sur un support plastique, les cellules stellaires vont spontanément s'activer et se différencier en myofibroblastes. Elles perdent leur morphologie caractéristique, leur capacité à stocker le rétinol et expriment des marqueurs de fibrose comme le α -SMA, après une semaine de culture (Kim et al., 2013).

La limite de ce modèle est la procédure de purification des HSCs, très délicate en raison de leur faible pourcentage dans le tissu hépatique. La méthode de prédilection de nombreux chercheurs pour isoler les HSCs est la centrifugation sur gradient de densité. Cette méthode implique la perfusion *in situ* du foie par des enzymes telles que la collagénase et la pronase, afin de dissocier les cellules hépatiques de la MEC environnante et de digérer le foie en cellules individuelles. Cette dissociation enzymatique est suivie par des étapes de centrifugation séquentielles à différentes forces g pour séparer les différents types de cellules hépatiques. Une étape de centrifugation de la suspension cellulaire sur gradient de densité (de type Nycodenz, histodenz ou Percoll) est ensuite réalisée afin d'isoler les HSCs des autres cellules hépatiques. Ce principe de centrifugation sur gradient de densité pour isoler les HSCs repose sur la présence, dans ces dernières, de gouttelettes lipidiques intracellulaires contenant de la vitamine A. Cela confère aux HSCs une densité plus faible que celle des autres cellules hépatiques, facilitant ainsi leur séparation (Figure 23). La suspension cellulaire obtenue peut encore être enrichie en HSCs grâce aux propriétés d'auto-fluorescence de la vitamine A. Ainsi, en utilisant le tri cellulaire par fluorescence (FACS) avec un laser ultraviolet

capable d'exciter la vitamine A, les HSCs peuvent être isolées avec une sélectivité élevée. Cette propriété d'auto-fluorescence permet également d'analyser, de manière rapide, la pureté des HSCs sous une lumière UV au microscope à fluorescence, sans réaliser de marquage spécifique (Figure 24) (Rombouts, 2015; Van de Bovenkamp et al., 2007; Yanguas et al., 2016).

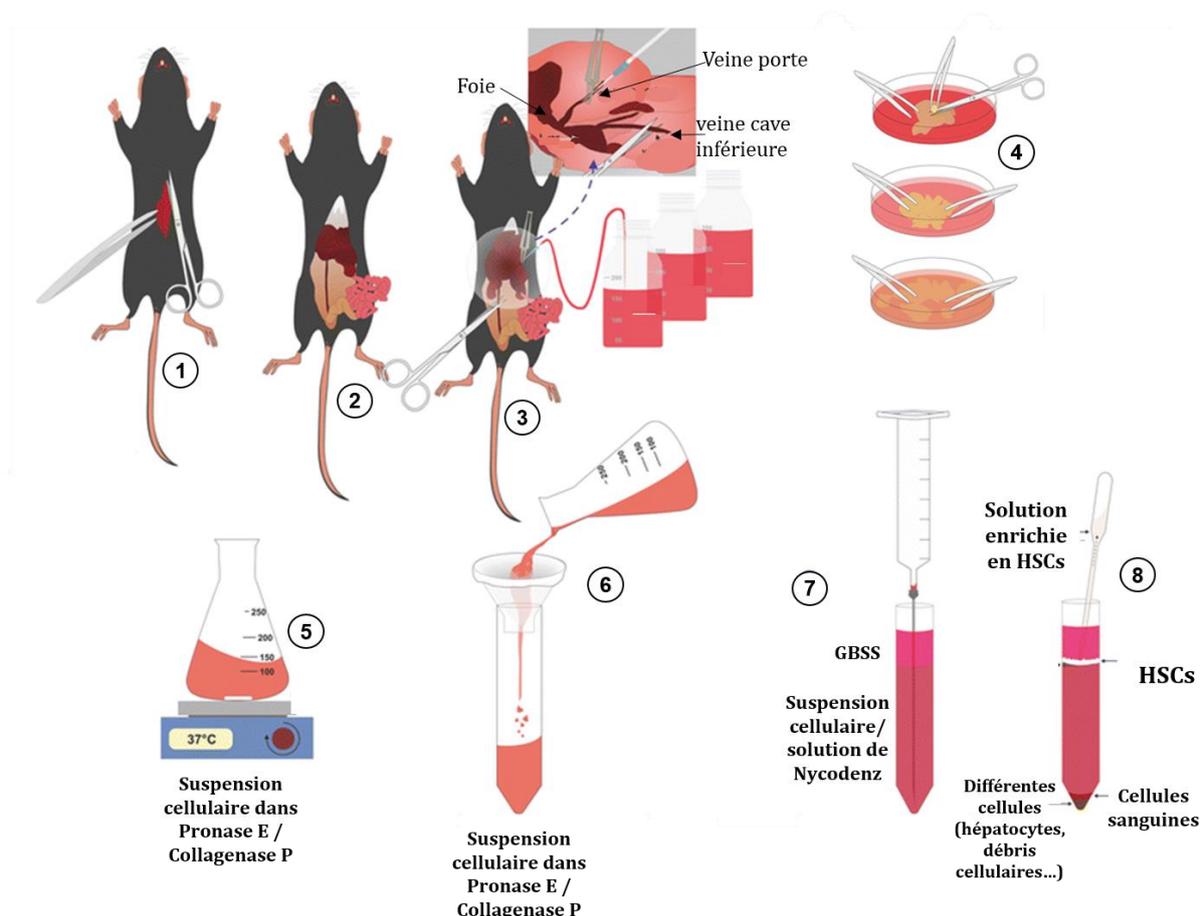


Figure 23 : Aperçu schématique du protocole d'isolement des HSCs murines.

La souris est anesthésiée et la cavité abdominale est ouverte (1). Le foie est exposé en plaçant l'intestin sur le côté (2). Le foie est ensuite perfusé à travers la veine porte avec différentes solutions enzymatiques (3). Les cellules hépatiques sont dispersées dans une boîte de culture stérile (4). Les amas de cellules restants sont dissous par agitation à 37°C (5). Par la suite, la solution est filtrée (6). Après plusieurs étapes de centrifugation, la suspension cellulaire est complétée par une solution de Nycodenz sous GBSS (7). Après centrifugation, les HSCs sont localisées dans l'interphase blanche, tandis que les hépatocytes et les cellules sanguines se situent au bas du gradient (8). Image adaptée de (Weiskirchen et al., 2017).

Cependant, cette méthode de centrifugation sur gradient de densité est difficilement utilisable pour isoler des HSCs à partir d'animaux jeunes, car le nombre de HSCs est faible chez ces animaux. Elle est également délicate à utiliser sur des animaux NAFLD dont les HSCs contiennent une faible teneur en lipides puisque l'étape de purification par centrifugation repose sur la faible densité des HSCs. Le protocole d'isolement de HSCs doit être adapté pour les modèles de fibrose et de stéatose (Rombouts, 2015; Yanguas et al., 2016).

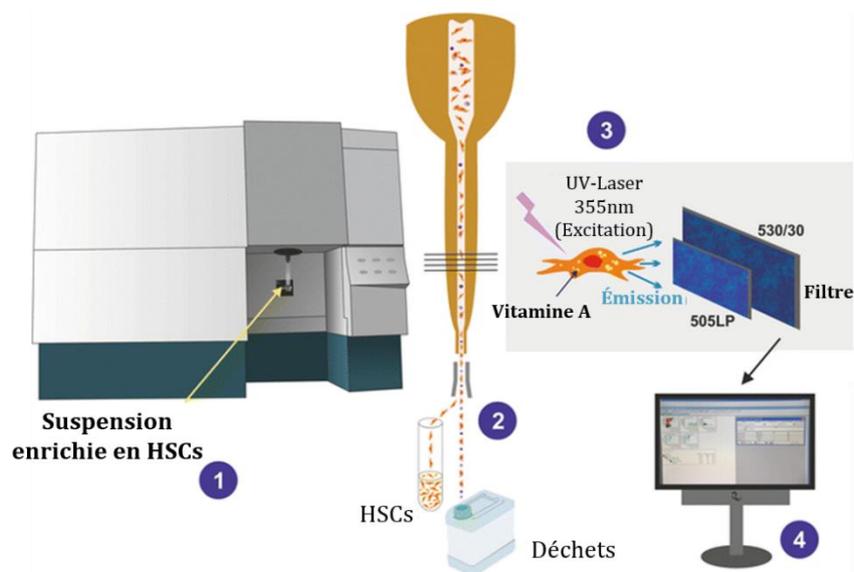


Figure 24 : Aperçu schématique du protocole de purification des HSCs via le tri cellulaire par fluorescence. La suspension de HSCs est placée dans la machine FACS (1). Le tri des HSCs se fait par excitation à la lumière UV d'un laser à 355 nm (2) et en mesurant l'émission du rétinol cellulaire (3). Le tri est contrôlé à l'aide d'un matériel et d'un logiciel appropriés (4). Image adaptée de (Weiskirchen et al., 2017).

Les HSCs primaires activées spontanément par une mise en culture présentent un profil d'expression génique différent de celui obtenu après activation *in vivo* sur les modèles murins de fibrose induite par le CCl₄ ou par BDL (De Minicis et al., 2007).

Une limitation supplémentaire de l'utilisation des cellules primaires est la durée pendant laquelle les cellules peuvent être maintenues en culture. De plus, malgré l'amélioration des techniques d'isolement et une pureté accrue, les cultures de HSCs peuvent être contaminées par d'autres types de cellules hépatiques, ce qui souligne l'intérêt de se tourner vers des lignées immortalisées de HSCs (Kim et al., 2013; Yanguas et al., 2016).

4.2.2 Lignées cellulaires

4.2.2.1 HSC-T6

Plusieurs lignées immortalisées de HSCs ont été développées, comme la lignée HSC-T6, issue de HSCs de rat. Ces cellules présentent un phénotype myo-fibroblastique et sont capables, en présence de rétinol, d'accumuler des esters de rétinyle dans leur cytoplasme, sous forme de gouttelettes lipidiques. L'expression des collagènes de type I, III et IV, de la fibronectine, de la laminine, de la vimentine, de la desmine, du α -SMA, du GFAP, des TIMP-1 et -2 et du TGF- β 1, suggère un phénotype de HSCs activées (Yanguas et al., 2016). Cependant, ces cellules expriment des récepteurs nucléaires de rétinoïdes, y compris les récepteurs RAR α , β et γ , caractéristiques des HSCs quiescentes (Kim et al., 2013). Par conséquent, elles peuvent se comporter à la fois comme des cellules activées et quiescentes (Yanguas et al., 2016). Les cellules HSC-T6 ont été utilisées pour étudier les voies de

signalisation impliquées dans l'expression du collagène, et pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour la fibrose hépatique (Yanguas et al., 2016).

4.2.2.2 Lignée humaine LX-2

Une autre lignée très étudiée est la lignée humaine de HSCs immortalisées LX-2 qui présente plusieurs avantages dont un potentiel de transfection élevé. Ces cellules expriment le α -SMA, la vimentine, la GFAP et les principaux récepteurs impliqués dans le processus de la fibrose hépatique, comme le récepteur au PDGF, mais aussi des protéines impliquées dans le remodelage de la MEC comme MMP-2 et TIMP-2. Cette lignée surexprime également le procollagène α 1 en réponse à une stimulation par le TGF- β . Les cellules LX-2 présentent donc un phénotype similaire aux HSCs activées. Cependant, elles conservent les caractéristiques clés des HSCs quiescentes dont la capacité d'absorption, d'accumulation et de conversion du rétinol en ester de rétinyle. Une comparaison de l'expression de 9 000 gènes par les HSCs humaines activées et les cellules LX-2 a révélé une homologie de 97,2% de l'expression des gènes étudiés (Herrmann et al., 2007; Xu, 2005).

4.2.2.3 GRX

GRX est une lignée cellulaire murine. En culture, ces cellules présentent un phénotype myo-fibroblastique. Cependant, en présence d'insuline ou de rétinol, elles adoptent un phénotype lipocytaire, de stockage de graisses. Cette capacité à absorber et à métaboliser le rétinol est similaire à celle des HSCs. Les deux phénotypes de GRX, myo-fibroblastique et lipocytaire, expriment les collagènes de type I, III et IV, la fibronectine, la laminine, la vimentine, la desmine, la GFAP et le α -SMA, mais l'expression des différents types de collagène, de la desmine et de la GFAP dans le phénotype lipocytaire reste faible. Par conséquent, la lignée GRX est un outil pertinent pour l'étude des modifications survenant lors de la fibrose hépatique, ainsi que l'action de molécules anti-fibrotiques sur la réversion du phénotype activé des HSCs (Yanguas et al., 2016).

Le Tableau 3 résume les principales caractéristiques, les avantages et inconvénients des modèles *in vitro* de la fibrose hépatique. En combinant l'utilisation des modèles animaux et des cultures cellulaires de cellules stellaires, les mécanismes sous-jacents au développement de la fibrose hépatique peuvent être étudiés et l'efficacité d'agents thérapeutiques potentiels peut être évaluée.

	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients
pHSCs	Cellules dérivées d'un foie sain (HSCs quiescentes) Cellules dérivées d'un foie fibrotique (myofibroblastes)	Lien étroit avec la situation <i>in vivo</i>	Activation des cellules lorsqu'elles sont mises sur un support plastique. Durée de vie limitée Hétérogénéité de la culture cellulaire
LX-2	Phénotype myo-fibroblastique Caractère quiescent lorsqu'elles sont cultivées sur Matrigel®	Lien étroit avec les HSCs primaires au niveau de l'expression génique Utiles pour l'étude de la sécrétion des composants de la MEC Potentiel de transfection élevé Viabiles dans des milieux sans sérum	/
GRX	Phénotype myofibroblastique Phénotype lipocytaire (en présence de rétinol)	Utiles pour l'étude des changements lipidiques et des molécules anti-fibrotiques	Aucune différence de l'expression génique entre les deux phénotypes
HSC-T6	En absence de rétinol : phénotype myo-fibroblastique En présence de rétinol : phénotype myo-fibroblastique avec des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme	Peut se comporter comme des HSCs activées et quiescentes Utile pour l'étude des voies de signalisation impliquées dans l'expression, la chimiotaxie et la contraction du collagène	Manque de corrélation avec les HSCs activées <i>in vivo</i>

Tableau 3 : Les principaux modèles *in vitro* de fibrose hépatique.

Adapté de (Yanguas et al., 2016).

La fibrose hépatique résulte d'une réponse de cicatrisation à une lésion hépatique chronique qui peut être due aux hépatites virales, à l'alcool ou encore aux maladies hépatiques non alcooliques. Les cellules stellaires hépatiques sont les cellules majoritairement responsables de la production du tissu cicatriciel. La compréhension de la physiopathologie de la fibrose hépatique nécessite la mise en place de différents modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro* pour mimer les interactions cellulaires hépatiques complexes et les voies de signalisation impliquées dans tous les aspects de la maladie. Idéalement, chaque modèle de fibrose hépatique devrait refléter les principales caractéristiques pathologiques et moléculaires de la maladie humaine. De plus, les modèles *in vivo* doivent être hautement reproductibles et faciles à mettre en place permettant ainsi d'évaluer l'efficacité d'agents anti-fibrotiques en pré-clinique. Malheureusement, ce type de modèle fait défaut. Par conséquent, tester les candidats-médicaments sur plusieurs modèles différents aiderait sans aucun doute au développement de stratégies thérapeutiques efficaces pour la fibrose qui n'a actuellement pas de traitement.

Chapitre II : Les approches thérapeutiques pour la fibrose hépatique

La progression de la compréhension de la pathogenèse de la fibrose hépatique a permis le développement de nouvelles approches thérapeutiques qui comprennent, à la fois l'étude de l'efficacité d'agents thérapeutiques potentiels sur des cibles moléculaires essentielles à la fibrogénèse et/ou à la fibrolyse, mais aussi la distribution ciblée de ces agents aux cellules impliquées dans ces processus, en particulier les cellules stellaires hépatiques. Alors que la majorité de ces nouvelles stratégies est encore expérimentale, quelques candidats-médicament sont en cours d'évaluation dans des études cliniques. A l'heure actuelle, il n'existe encore aucune molécule anti-fibrotique commercialisée démontrant des effets cliniques positifs sur la fibrose hépatique chez l'humain.

1. La réversibilité de la fibrose

Après une lésion hépatique aiguë, le foie peut restaurer sa masse complète et son architecture d'origine dans un intervalle relativement court, même lorsqu'une grande partie de l'organe est endommagée (Trautwein et al., 2015). En revanche, une lésion hépatique chronique, déclenchée par différentes étiologies, induit des dommages tissulaires répétitifs, entraînant une altération de la capacité de régénération du foie (Bataller and Brenner, 2005; Lee et al., 2015b). La fibrose hépatique avancée a longtemps été considérée comme un processus irréversible (Benyon and Iredale, 2000; Ismail and Pinzani, 2009; Kumar and Sarin, 2007). Cependant, plusieurs études récentes ont confirmé que le processus de fibrogénèse hépatique est dynamique, et que la régression d'une fibrose avancée, et même d'une cirrhose, est possible, à la fois sur des modèles animaux et chez l'humain (Benyon and Iredale, 2000; Huang et al., 2017). Plusieurs études cliniques et précliniques ont montré que la suppression de la cause principale des lésions hépatiques est la stratégie la plus efficace pour la régression de la fibrose, en particulier dans les premiers stades de la maladie. Nous allons décrire ci-dessous quelques preuves cliniques de la réversibilité de la fibrose, selon l'étiologie de la maladie.

1.1 Fibrose due aux Hépatites virales

La suppression du virus de l'hépatite B (VHB) ou C (VHC) peut entraîner la régression de la fibrose et même de la cirrhose. En effet, le traitement par la lamivudine, une molécule antivirale impliquée dans la suppression de la réplication du VHB, induit une diminution de la fibrose

hépatique chez les patients atteints d'hépatite B (Kweon et al., 2001). De même, le traitement par le tenofovir disoproxil fumarate pendant 240 semaines de patients VHB+ atteints de fibrose ou de cirrhose induit une régression de la fibrose, chez 51% des patients. Une diminution de la cirrhose a également été observée chez 74% des patients atteints de cirrhose (Marcellin et al., 2013). Enfin, la combinaison d'interféron PEGylé et de ribavirine entraîne une diminution importante de la teneur en collagène dans le foie chez 89% des patients VHC+ atteints de cirrhose, ainsi qu'une régression significative de la cirrhose chez 61% d'entre eux. Cependant, aucun changement significatif de l'inflammation portale et de la capillarisation des sinusoides n'a été observé (D'Ambrosio et al., 2012).

Depuis cinq ans, le traitement de l'hépatite C a été révolutionné avec l'introduction de médicaments antiviraux à action directe (AAD) oraux qui se sont avérés très efficaces pour guérir les patients atteints d'hépatite C chronique, y compris les patients atteints de cirrhose. À ce jour, de nombreuses études ont mis en évidence une amélioration dans plusieurs marqueurs non invasifs de fibrose (APRI, FIB-4), après un traitement par les AAD ainsi qu'une diminution de la rigidité hépatique (Elsharkawy et al., 2017; Knop et al., 2016; Kobayashi et al., 2018; Lens et al., 2017). Cependant, une étude évaluant 10 biopsies appariées de patients traités par les AAD a montré que la régression de la fibrose se produit mais n'est pas aussi importante que les mesures de la rigidité hépatique pourraient l'indiquer (Pockros et al., 2017). Ainsi, les données provenant de biopsies appariées évaluant la régression de la fibrose après un traitement par les AAD sont rares et le suivi est encore relativement court.

1.2 Fibrose induite par l'alcool

Les preuves de régression de la fibrose dans les maladies hépatiques alcooliques (ALD) sont limitées. A ce jour, il n'y a que l'abstinence d'alcool qui est associée à la régression de la fibrose ou de la cirrhose chez les patients atteints d'ALD. Le sevrage alcoolique chez 135 patients atteints d'une ALD a induit une diminution significative de la « dureté » hépatique mesurée par Fibroscan, chez près de la moitié des gros buveurs, après seulement 7 jours d'abstinence. Une réduction du stade estimé de la fibrose a été observée chez 23% des patients (Trabut et al., 2012). De même, chez des patients atteints de cirrhose alcoolique, l'abstinence d'alcool à 1 mois après le diagnostic de la cirrhose, était le plus important facteur déterminant la survie à 7 ans. Cette dernière était de 72% pour les patients abstinents, contre 44% pour les patients continuant à boire (Verrill et al., 2009). Cependant, il n'y a que très peu d'études caractérisant les changements morphologiques et / ou les voies moléculaires associées à la régression de la fibrose chez les patients atteints d'ALD, après une abstinence prolongée (Lackner and Tiniakos, 2019).

1.3 Fibrose induite par la NASH

A l'heure actuelle, aucun traitement efficace n'existe pour la NASH. Cependant, des études cliniques ont montré que la perte de poids, obtenue soit par modification du mode de vie, soit par chirurgie bariatrique, peut réduire les caractéristiques histologiques de la NASH (stéatose, ballonnisation des hépatocytes, inflammation) ainsi que la fibrose hépatique (Lee et al., 2019).

La mise en place de l'exercice physique dans les programmes de changement de style de vie s'est avérée plus durable dans le temps que l'intervention alimentaire seule dans la NASH (Musso et al., 2010). Il a été démontré qu'une perte de poids $\geq 7\%$, obtenue en combinant régime alimentaire et exercice pendant 48 semaines, améliore de manière significative la stéatose, l'inflammation et la ballonnisation hépatocellulaire chez des patients en surpoids ou obèses et atteints de NASH (Promrat et al., 2010). Une diminution de la stéatose hépatique a également été observée chez tous les patients atteints de NASH, qui avaient perdu plus de 10% de leur poids, en adoptant des changements de style de vie, sur 52 semaines. 90% d'entre eux avaient une résolution de la NASH et 45% présentaient une régression de la fibrose (Vilar-Gomez et al., 2015).

La perte de poids, après chirurgie bariatrique réalisée sur des patients obèses dont certains étaient atteints de NASH, diminue la stéatose et l'inflammation. 25 mois en moyenne après la chirurgie, une diminution du stade de fibrose a également été observée chez 15 patients, parmi les 18 qui présentaient un score de fibrose initial de 2 ou plus (Dixon et al., 2004). De même, une disparition de la NASH a été observée, 1 an après la chirurgie bariatrique, chez 94% de patients souffrant d'obésité morbide et qui présentaient une NASH légère avant la chirurgie, tandis que ce pourcentage était de 70% chez les patients atteints de NASH sévère au départ. Quant à la fibrose, elle a été réduite chez 33,8% des patients (Lassailly et al., 2015).

En effet, la perte de poids peut améliorer les caractéristiques histologiques de la NASH ; une perte de poids de 5% peut réduire la stéatose et les paramètres métaboliques associés. Cependant, des degrés plus élevés de perte de poids sont nécessaires pour améliorer la fibrose (Musso et al., 2010). Ainsi, une méta-analyse réalisée sur 32 études de cohorte, comprenant 3093 échantillons de biopsie, a montré que la perte de poids liée à la chirurgie bariatrique entraînait une réduction de la stéatose et de l'inflammation chez 66% et 50% des patients, respectivement, tandis qu'une résolution de la fibrose était observée chez seulement 40% des patients (Lee et al., 2019).

Pour conclure, la régression de la fibrose est désormais une réalité en milieu clinique. Les études confirment que la fibrose hépatique est un processus dynamique lié à la capacité de récupération et de remodelage du foie. Cliniquement, les preuves les plus convaincantes de la régression de la fibrose proviennent des études à grande échelle sur les thérapies antivirales pour le traitement de l'hépatite B. Par ailleurs, des études cliniques, comme celles décrites ci-dessus, indiquent clairement que la perte de poids favorise une certaine réversibilité de la fibrose induite par la NASH, bien que le pourcentage des patients présentant une réduction de la fibrose reste faible. Des études prospectives sur un nombre plus important de patients sont nécessaires pour examiner les avantages thérapeutiques de la chirurgie bariatrique ou du changement de mode de vie pour les patients atteints de NASH. Les futures études pourront également évaluer si la combinaison de régimes efficaces pour la perte de poids avec des candidats-médicaments présente des avantages synergiques sur l'histologie hépatique (Musso et al., 2010).

2. Stratégies thérapeutiques basées sur les mécanismes de la fibrogénèse hépatique

Le traitement de la fibrose hépatique devrait idéalement inclure le traitement de la maladie sous-jacente. Cependant, pour certains patients, même si la cause de la maladie est éliminée, la fibrose hépatique peut persister et même progresser, comme cela a été rapporté chez 4% de patients guéris du VHC, pour qui une progression de la fibrose s'est produite (Balmaceda et al., 2019), ou chez certains patients atteints de NASH après chirurgie bariatrique (Lee et al., 2019). De plus, le traitement de la maladie sous-jacente n'est pas toujours possible, notamment pour les maladies cholestatiques, pour lesquelles les traitements spécifiques à l'étiologie font défaut (Lemoinne and Friedman, 2019). En outre, l'inversion d'une maladie avancée peut ne pas être suffisamment rapide pour prévenir les complications (Schuppan, 2015). Ainsi, les traitements anti-fibrotiques sont toujours indispensables, quelle que soit la cause sous-jacente de la maladie du foie (Lemoinne and Friedman, 2019). Il est donc important de clarifier les différents mécanismes moléculaires à cibler, afin d'établir et de valider cliniquement des agents anti-fibrotiques qui empêcheraient la progression de la fibrose, voire induiraient sa régression (Schuppan, 2015).

Les fondements de la thérapie de la fibrose hépatique reposent sur six points (Figure 25) :

- (i) L'inhibition de l'apoptose des hépatocytes
- (ii) L'inhibition de l'inflammation et de la réponse immunitaire
- (iii) L'inhibition de l'activation et de la prolifération des HSCs
- (iv) L'élimination des myofibroblastes activés *via*
 - L'apoptose ou la sénescence
 - L'inversion phénotypique
 - L'action des cellules immunitaires
- (v) L'inhibition de la production de la MEC
- (vi) L'induction de la dégradation de la matrice en excès

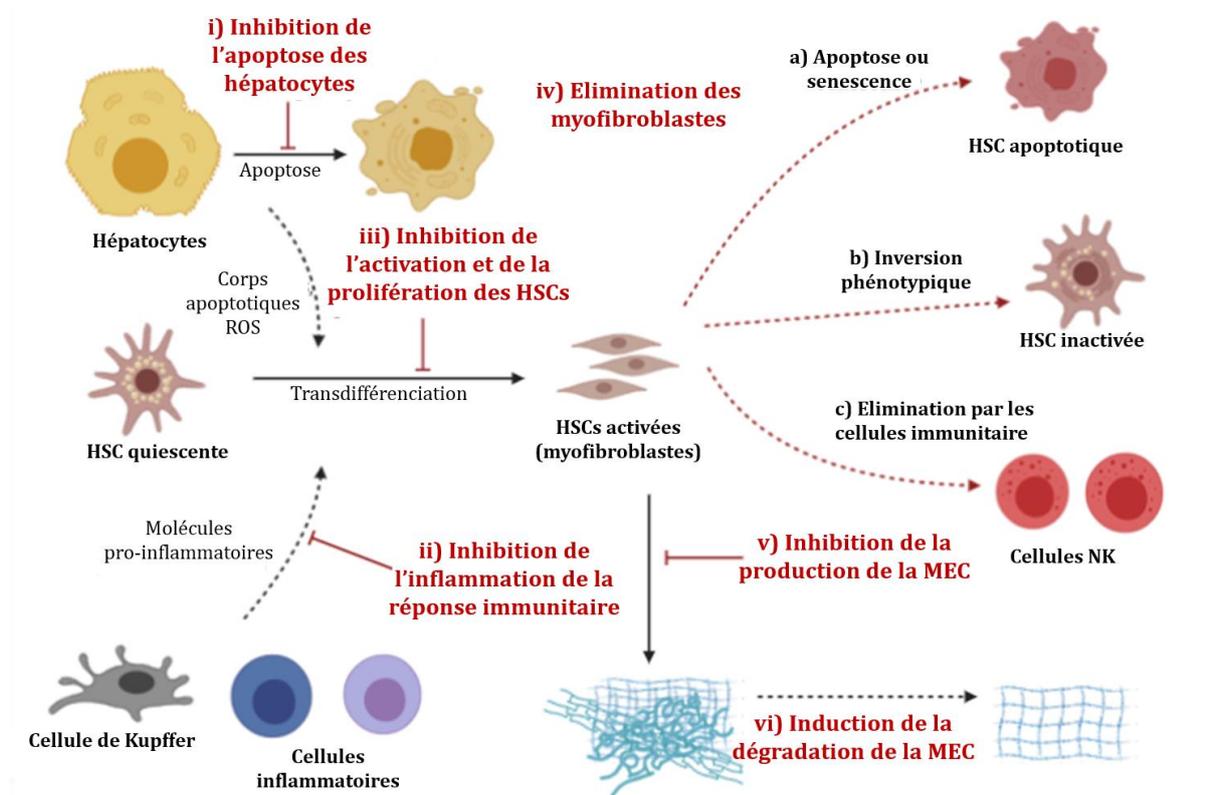


Figure 25 : Représentation des différentes stratégies thérapeutiques basées sur les mécanismes de la fibrogénèse.

2.1 Inhibition de l'apoptose des hépatocytes

La mort des cellules hépatocytaires par apoptose est un déclencheur majeur de l'inflammation et de l'activation des HSCs au cours l'évolution de la fibrogénèse hépatique, toute étiologie confondue (Roehlen et al., 2020). Réduire ou inhiber l'apoptose des hépatocytes pourrait améliorer les caractéristiques pathologiques de la fibrose. Ainsi, la caspase 3, une enzyme pro-apoptotique, appartenant à la famille de protéases à cystéine, a été identifiée comme étant

le principal acteur de la mort des cellules apoptotiques. Une réduction significative de l'expression des gènes pro-fibrogéniques et des dépôts de collagène a été observée chez des souris caspase 3 (- / -) soumises à un régime MCD, par rapport aux souris Wild Type soumises au même régime. Ces changements étaient associés à une diminution des niveaux d'apoptose et à une réduction significative de l'expression des cytokines impliquées dans la signalisation inflammatoire (Thapaliya et al., 2014).

L'utilisation des inhibiteurs des caspases a été proposée comme approche thérapeutique pour la fibrose hépatique, et a été étudiée dans plusieurs modèles précliniques (Canbay et al., 2004; Gracia-Sancho et al., 2019; Roychowdhury et al., 2012; Witek et al., 2009). En effet, un groupe de chercheurs a montré que l'inhibition de l'apoptose des hépatocytes par VX-166, un pan-inhibiteur de caspase, chez des souris db/db suivant un régime MCD, diminue l'expression du α -SMA et du collagène, confirmant l'amélioration de la fibrose hépatique. Une diminution de la stéatose hépatique a également été observée (Witek et al., 2009). L'administration de l'Emricasan, un autre pan-inhibiteur de caspase, à des rats atteints de cirrhose avancée induite par le CCl₄, a induit des effets hépato-protecteurs, avec une amélioration significative de la fonction hépatique. Une réduction de l'inflammation hépatique et de la fibrose, ainsi qu'une amélioration du phénotype des cellules hépatiques (hépatocytes, cellules endothéliales sinusoidales, HSCs et macrophages) ont été observées (Gracia-Sancho et al., 2019). Cette étude a encouragé l'évaluation clinique de l'Emricasan dans le traitement des maladies hépatiques chroniques avancées (voir 3.6 Traitements ciblant l'inflammation et l'apoptose page 100).

Une autre approche pour réduire l'apoptose des hépatocytes associée aux lésions hépatiques consiste à inhiber les signaux de stress. La kinase régulatrice du signal d'apoptose (ASK1), appartenant aux voies de MAPK, est impliquée dans l'apoptose hépatique, l'inflammation et la fibrose (Roehlen et al., 2020). L'administration d'un inhibiteur sélectif d'ASK1, a induit une amélioration de la fibrose hépatique dans un modèle murin de NASH (Budás et al., 2016).

2.2 Inhibition de l'inflammation et de la réponse immunitaire

L'inflammation chronique est la principale cause de fibrogénèse hépatique et s'est avérée présente dans la majorité des maladies hépatiques chroniques, quelle que soit l'étiologie (Jung and Yim, 2017). L'élimination des stimuli pro-inflammatoires peut conduire à un passage d'un état pro-inflammatoire à un état anti-inflammatoire et réparateur, induisant la résolution de la fibrose hépatique (Zoubek et al., 2017). Le TGF- β 1 représente la plus importante molécule pro-inflammatoire impliquée dans la fibrogénèse (Jung and Yim, 2017). Cependant, l'inhibition systémique du TGF- β 1 entraîne une inflammation accrue (Samarakoon et al., 2013). Une des stratégies proposées par les chercheurs était de cibler des étapes spécifiques de l'activation

du TGF- β 1, notamment *via* l'inhibition de l'intégrine $\alpha_v\beta_6$. Cette dernière sert de corécepteur pour l'activation du TGF- β 1 natif et semble être surexprimée au cours de la fibrose. L'inhibition pharmacologique par un antagoniste spécifique de l'intégrine $\alpha_v\beta_6$, entraîne une réduction significative de l'activation du TGF- β 1 et de la production du collagène, inhibant ainsi la progression de la fibrose hépatique sur un modèle de rats BDL (Patsenker et al., 2008).

Enfin, un certain nombre d'agents ayant une activité anti-inflammatoire, utilisés dans d'autres maladies inflammatoires chroniques, sont également étudiés pour éliminer les stimuli induisant l'activation des HSCs et le développement de la fibrose. Ainsi, les corticostéroïdes, les antagonistes du TNF- α ou de NF κ B, les antagonistes des enzymes de conversion de l'angiotensine et / ou les antagonistes des récepteurs de l'angiotensinogène II peuvent présenter une activité anti-fibrotique intéressante (Friedman, 2008b).

Outre l'élimination des stimuli pro-inflammatoires, les macrophages jouent un rôle clé, à la fois, dans la fibrogénèse, mais aussi dans la fibrolyse et représentent un autre composant important de la régression de la fibrose hépatique (Schuppan, 2015; Sun and Kisseleva, 2015).

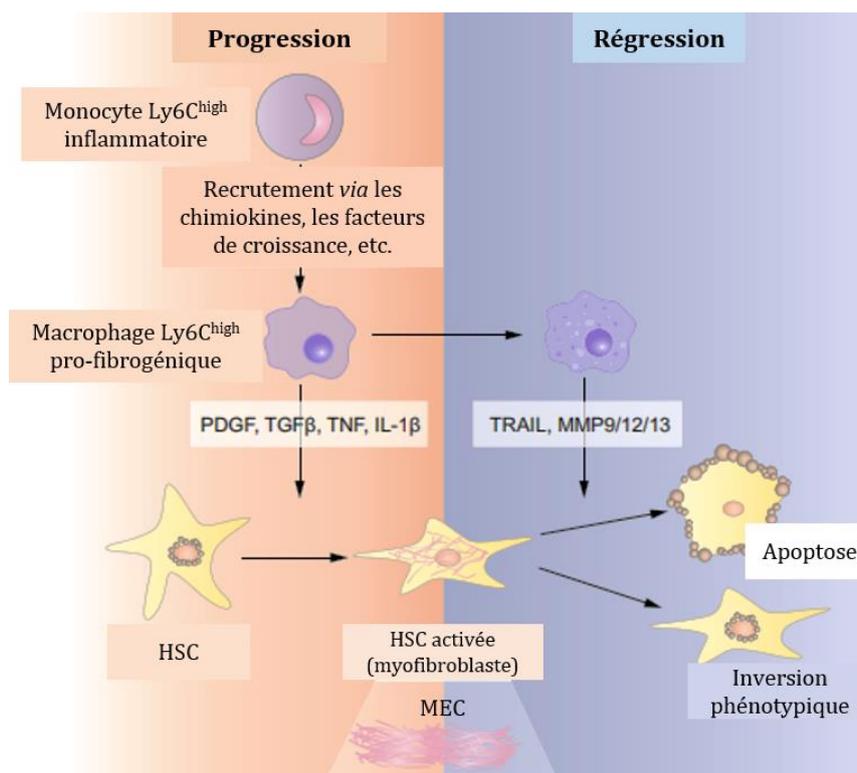


Figure 26 : Rôle des macrophages dans la progression et la régression de la fibrose hépatique.

Interaction entre les macrophages et les HSCs pendant la progression et la résolution de la fibrose hépatique. Une lésion hépatique aiguë ou chronique déclenche le recrutement de macrophages inflammatoires (Ly6C^{high}) dans le foie, qui induisent l'activation des HSCs *via* des facteurs solubles, comme les facteurs de croissance, les cytokines et les chimiokines. Les HSCs activées (myofibroblastes) produisent de la MEC en continu. Si la lésion hépatique est arrêtée (par ex. en éliminant l'agent causal) les macrophages acquièrent un phénotype Ly6C^{low} réparateur et perdent leur capacité à stimuler les myofibroblastes. Par conséquent, ces dernières subissent une apoptose ou une inversion phénotypique. Image adaptée de (Trautwein et al., 2015).

En général, les macrophages sont divisés en 2 sous-types en fonction de leur état d'activation. Les macrophages M1 sont fonctionnellement pro-inflammatoires et antimicrobiens, tandis que les macrophages M2 sont anti-inflammatoires (Yao et al., 2019). Lors de l'inversion de la fibrose hépatique, les macrophages intrahépatiques subissent des changements de leur phénotype, adoptant un caractère fibrolytique, réparateur. En effet, les macrophages associés à la résolution de la fibrose hépatique présentent un phénotype en dehors de la classification M1/M2, et ont été appelés SAM ou « *scar-associated Macrophages* » (Roehlen et al., 2020). Ils sont caractérisés par une faible expression de Ly-6C, alors que les macrophages ayant un caractère pro-fibrogénique présentent une expression élevée de Ly-6C. Ce phénotype réparateur est également caractérisé par une augmentation de la production de MMP (MMP-9, MMP-13), et de l'expression de récepteurs associés à la phagocytose, ainsi qu'une sécrétion atténuée de TGF- β 1 (Issa et al., 2004; Popov et al., 2010; Ramachandran et al., 2012). La production de MMP, par ces macrophages, contribue à la dégradation de la MEC existante, lors de la régression de la fibrose hépatique (Figure 26) (Sun and Kisseleva, 2015). Par conséquent, cibler les macrophages ayant un caractère pro-fibrogénique, soit en les inhibant, par exemple, en utilisant des anticorps dirigés contre le récepteur aux chimiokines CCR2, ou en changeant leur phénotype pour acquérir un caractère fibrolytique, est une stratégie thérapeutique intéressante pour diminuer l'inflammation lors de la fibrose (Baeck et al., 2014; Schuppan, 2015)

2.3 Inhibition de l'activation et de la prolifération des HSCs

L'inhibition de la transformation des HSCs quiescentes en myofibroblastes activés, et de leur prolifération, est une stratégie particulièrement intéressante, compte tenu du rôle central que jouent ces cellules dans la fibrogénèse. Au cours des dix dernières années, un certain nombre d'études ont abordé ce processus. Cependant, la voie la plus efficace pour l'inhibition de l'activation des HSCs reste inconnue (Huang et al., 2017).

2.3.1 Stress oxydatif

Une des approches pour inhiber l'activation des HSCs est de réduire le stress oxydant. En effet, en plus des cytokines inflammatoires, le stress oxydatif, ou la génération de ROS, joue un rôle important dans l'activation de HSCs. Les antioxydants peuvent atténuer la génération de ROS. Un certain nombre d'antioxydants, par exemple, la S-adénosyl-L-méthionine (SAmE), la silymarine, la phosphatidylcholine, la N-acétyl-cystéine (NAC) et la vitamine E, peuvent induire une réduction de l'activation des HSCs (Sanyal, 2010).

Les nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydases, ou NOX, sont des complexes enzymatiques liés à la membrane qui produisent des ROS dans les HSCs. NOX1,

2 et 4 exercent des rôles clés dans l'activation des HSCs au cours de la fibrogénèse hépatique et NOX4 est impliquée dans l'apoptose des hépatocytes. L'utilisation de GKT137831, un double inhibiteur de NOX1 / 4, peut induire une diminution de la production de ROS par les HSCs *in vitro* et *in vivo*, et une réduction de l'expression des gènes pro-fibrogéniques, ainsi qu'une atténuation significative de la fibrose hépatique dans les modèles CCl₄ et BDL (Aoyama et al., 2012). L'effet de GKT137831 sur la fibrose est actuellement évalué en clinique (NCT03226067).

2.3.2 Récepteurs nucléaires

Comme décrit dans le premier chapitre, page 62, l'expression de PPAR- γ diminue lors de l'activation des HSCs, permettant leur transdifférenciation vers un phénotype myofibroblastique. La restauration de l'expression de PPAR- γ dans les HSCs activées conduit à une inversion partielle de leur phénotype fibrogénique. Cette inversion est associée à une diminution de la capacité de prolifération et une réduction de l'expression du collagène (Mann and Mann, 2009). L'utilisation des agonistes de PPAR- γ ou de FXR peut exercer un effet antifibrotique *in vitro* et *in vivo*, en réduisant l'activation des HSCs et l'expression du collagène (Fiorucci et al., 2004; Yang et al., 2006). Des agonistes de PPAR- γ et de FXR sont actuellement évalués en clinique (voir 5. Essais cliniques en cours).

2.3.3 Voie Wnt / β -caténine

De nombreuses études indiquent que la signalisation Wnt / β -caténine est impliquée dans l'activation des HSCs et contribue à la fibrose hépatique (Roehlen et al., 2020). Il a été décrit que l'inhibition de cette voie de signalisation avec l'inhibiteur ICG-001, qui perturbe spécifiquement l'interaction entre le CBP (*CREB binding protein*) et la β -caténine, atténue, de manière considérable, l'accumulation de collagène et l'activation des HSCs *in vivo* dans un modèle murin de fibrose induite par le CCl₄. De plus, une inhibition de l'infiltration des macrophages et de l'inflammation intrahépatique a également été mise en évidence (Akcora et al., 2018).

2.3.4 Système endocannabinoïde

Le système endocannabinoïde joue un rôle important dans diverses maladies du foie, y compris les hépatites virales, les NAFLD et les maladies hépatiques alcooliques. Les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 sont régulés positivement dans les maladies chroniques du foie et plusieurs études ont démontré, l'antagonisme entre CB1 et CB2, c'est-à-dire que CB1 favorise, tandis que CB2 supprime, les lésions hépatiques (Bansal et al., 2016). L'utilisation des antagonistes de CB1 et des agonistes de CB2 a donc été étudiée comme approche thérapeutique potentielle pour les maladies du foie. L'inhibition de CB1 a permis une

diminution de l'activation des myofibroblastes et une atténuation de la fibrose hépatique dans un modèle murin de fibrose induite par le CCl₄ (Giannone et al., 2012). Cependant, les effets secondaires psychoactifs tels que la dépression, chez l'humain, limitent l'utilisation de ces molécules (Bansal et al., 2016).

2.4 Elimination des HSCs activées

Comme évoqué dans le premier chapitre, lors de la fibrose, de nombreuses sources de myofibroblastes hépatiques ont été identifiées, notamment les fibroblastes portaux, les fibrocytes dérivés de la moelle osseuse et les HSCs qui constituent plus de 80% des cellules productrices de collagène. Le sort de ces myofibroblastes au cours de la régression de la fibrose a été récemment révélé : certains d'entre eux subissent une sénescence ou une apoptose, tandis que d'autres reviennent à un phénotype de type quiescent (Figure 27). L'élimination des myofibroblastes ou leur inactivation représente une approche thérapeutique intéressante (Liu et al., 2013).

2.4.1 Induction de l'apoptose ou la sénescence des HSCs

Les HSCs activées sont caractérisées par une expression élevée des récepteurs de mort, et sont sensibles à l'apoptose, en particulier, en réponse à la réduction des signaux pro-fibrogéniques (Oh et al., 2016; Sun and Kisseleva, 2015). Plusieurs mécanismes peuvent contribuer à l'apoptose des HSCs : (1) l'activation des voies de mort cellulaire *via* notamment Fas ou TNFR-1 et les caspases 3 et 8; (2) la régulation positive des protéines pro-apoptotiques (comme p53, Bax et caspase 9); et (3) la diminution de l'expression des gènes pro-survie tels que Bcl-2 (Iredale, 2001). Ainsi, la stimulation de l'apoptose des HSCs activées est une stratégie thérapeutique potentielle pour la fibrose (Huang et al., 2017). Par exemple, l'injection intraveineuse de TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) PEGylé induit l'apoptose des HSCs activées *in vivo* et améliore la fibrose induite par le CCl₄ chez le rat, en régulant à la baisse plusieurs marqueurs fibrotiques (Oh et al., 2016). Cependant, induire la mort cellulaire, comme mode de traitement pour une maladie, comporte un risque, car la plupart des thérapies sont peu susceptibles d'agir spécifiquement et uniquement sur les cellules cibles. Le risque est donc la stimulation de l'apoptose dans des cellules autres que les cellules cibles, avec des effets indésirables potentiels (Douglass et al., 2008a).

En plus de l'apoptose, il a été montré qu'une proportion des HSCs activées expriment des marqueurs de sénescence (un arrêt du cycle cellulaire dû à un raccourcissement des télomères) lors de la régression de la fibrose (Krizhanovsky et al., 2008). Des protéines telles que l'IL-22, le facteur de croissance analogue à l'insuline I (IGF-I) et des médicaments comme l'atorvastatine, la tétraméthylpyrazine ou le célécoxib agissent comme des inducteurs de

sénescence dans les HSCs (Zoubek et al., 2017). L'acide rétinoïque induit également la sénescence des HSCs, et peut favoriser l'inversion de la fibrose hépatique, en modulant le potentiel fibrogénique des HSCs ; il peut également agir en synergie avec le récepteur PPAR- γ (Panebianco et al., 2017). Ainsi, un arrêt de la prolifération des HSCs est observé, associé à l'augmentation de l'expression des enzymes dégradant la MEC, une diminution de l'expression des protéines de la MEC ainsi qu'une accumulation de cellules immunitaires accélérant l'élimination des HSCs (Krizhanovsky et al., 2008). Cependant, les mécanismes spécifiques impliqués dans la sénescence restent à élucider (Huang et al., 2017).

2.4.2 Induction de l'inversion phénotypique des HSCs

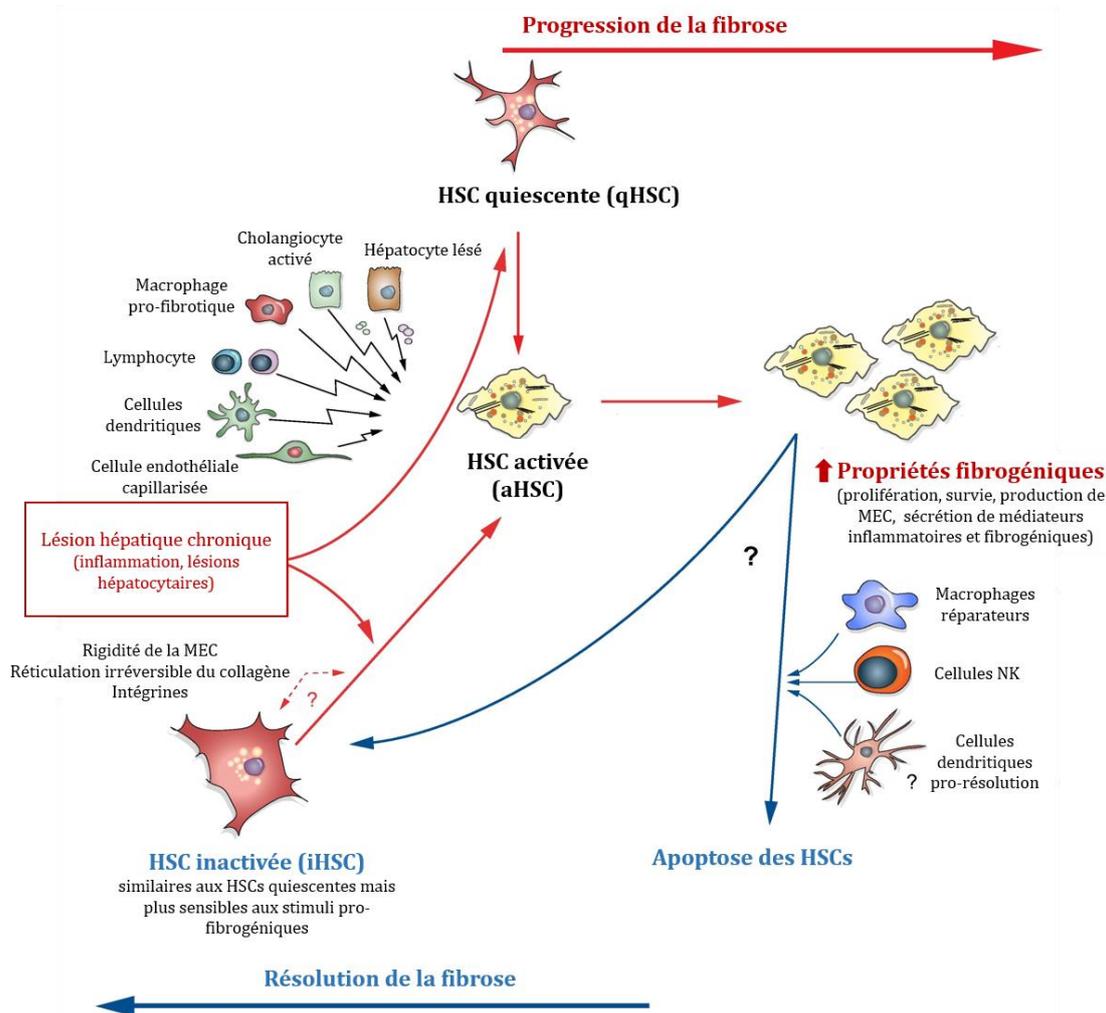


Figure 27 : Le devenir des HSCs pendant la progression et la résolution de la fibrose hépatique.

Lors d'une lésion hépatique, les HSCs subissent une transdifférenciation d'un phénotype quiescent à un phénotype myo-fibroblastique. Le processus est orchestré par des interactions avec les cellules voisines (hépatocytes, cellules immunitaires, cellules endothéliales sinusoidales...), les composants de la MEC, les interactions médiées par les intégrines et la rigidité de la MEC. Les HSCs activées se caractérisent par une capacité accrue de proliférer et de produire des médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques et sont responsables de la sécrétion de la MEC qui caractérise la fibrose hépatique. L'élimination des HSCs activées est une étape clé dans la régression de la fibrose. Les HSCs peuvent subir une apoptose (favorisée par les cellules NK, les cellules dendritiques et les macrophages pro-résolution), ou une réversion vers un phénotype inactivé ou intermédiaire avec une sensibilité accrue aux futurs stimuli pro-fibrogéniques. Image adaptée de (Mallat and Lotersztajn, 2013).

D'autres études expérimentales, *in vitro* et *in vivo* notamment sur le modèle CCl₄, ont montré que les HSCs activées (aHSCs) peuvent échapper à l'apoptose et subir une inversion phénotypique vers un statut « inactif » après l'arrêt des lésions hépatiques (Kisseleva et al., 2012; Troeger et al., 2012). Cependant, ces HSCs inactivées (iHSCs) acquièrent un nouveau phénotype intermédiaire « pré-activé ». Elles sont plus sensibles aux stimuli pro-fibrogéniques, et contribuent plus efficacement à la fibrose hépatique (Liu et al., 2013). De plus, elles sont caractérisées par une diminution de l'expression des gènes fibrogéniques (tels que α -SMA, Col1 α 1, TIMP-1 et TGF- β R1), et une réexpression des gènes lipogéniques, en particulier PPAR- γ , ce qui est similaire aux HSCs quiescentes (qHSCs). En revanche, d'autres gènes associés à la quiescence (comme GFAP, Adipor1, Adpf et Dbp) ne sont pas ré-exprimés dans les iHSCs, ce qui suggère que, malgré les similitudes entre les qHSCs et les iHSCs, une expression génique différentielle est observée (Kisseleva et al., 2012; Troeger et al., 2012). Cette expression génique différentielle peut être utilisée pour distinguer les différentes populations d'HSCs en fonction de leur stade d'activation (qHSC, iHSC, aHSC) (Sun and Kisseleva, 2015). L'inactivation des HSCs est également associée à une régulation positive des gènes anti-apoptotiques, tels que Hspa1a/b, qui participent à la survie des HSCs en culture et *in vivo* (Jung and Yim, 2017). En revanche, des recherches supplémentaires seront nécessaires pour comprendre comment contrôler la réversibilité des HSCs, et développer des stratégies permettant de les orienter vers un état quiescent (Figure 27).

2.4.3 Élimination des myofibroblastes par les cellules immunitaires

En parallèle des macrophages, les cellules tueuses naturelles (NK) et les cellules T $\gamma\delta$ spécifiques du foie (NKT), sont également impliquées dans la régression de la fibrose, en induisant l'apoptose des HSCs (Liu et al., 2013). Des études ont montré que ces lymphocytes peuvent synthétiser et sécréter une variété de cytokines et tuer directement les HSCs *via* la production d'IFN- γ et d'IL-30, et améliorer ainsi la fibrose hépatique (Radaeva et al., 2006). Les cellules NK peuvent également induire une apoptose précoce des HSCs activées par des voies modulées par le ligand TRAIL et par l'expression de l'acide rétinoïque inducible (RAE1) dans les HSCs (Radaeva et al., 2006). L'IL-22 produite par les cellules T activées peut induire la sénescence des HSCs et améliorer la fibrogénèse hépatique, en induisant l'expression à la fois de l'IL-10R2 et de l'IL-22R1 (Huang et al., 2017). Sur la base de ces voies induisant l'élimination des HSCs, la sénescence des HSCs par activation des lymphocytes T est une nouvelle stratégie intéressante pour le traitement de la fibrose.

2.5 Inhibition de la production de la MEC

L'inhibition de la production matricielle constitue la cible principale de la plupart des thérapies anti-fibrotiques étudiées, soit directement en bloquant la synthèse de la matrice, ou

indirectement en inhibant l'activité des cytokines pro-fibrogéniques, en particulier le TGF- β 1 (Friedman, 2008b). Plusieurs études ont utilisé des siRNA pour inhiber la production des éléments de la MEC notamment le collagène, ces approches seront décrites plus loin (voir Chapitre IV).

Les lysyl oxydases (LOX) sont des enzymes sécrétées par les HSCs et les myofibroblastes portaux qui comprennent cinq isoformes : LOX et les enzymes de type LOX (LOXL1 à 4). Ces enzymes sont responsables de la réticulation covalente intra et intermoléculaire des fibres de collagène et d'élastine, altérant leur dégradation par les MMPs, ce qui contribue à la rigidité de la MEC (Figure 28). Cette dernière favorise à son tour l'activation et la prolifération des myofibroblastes *via* les intégrines, qui coopèrent étroitement avec les facteurs de croissance, et d'autres composants fonctionnels présents dans l'environnement extracellulaire, comme le TGF- β 1 (Patsenker and Stickel, 2011; Roehlen et al., 2020).

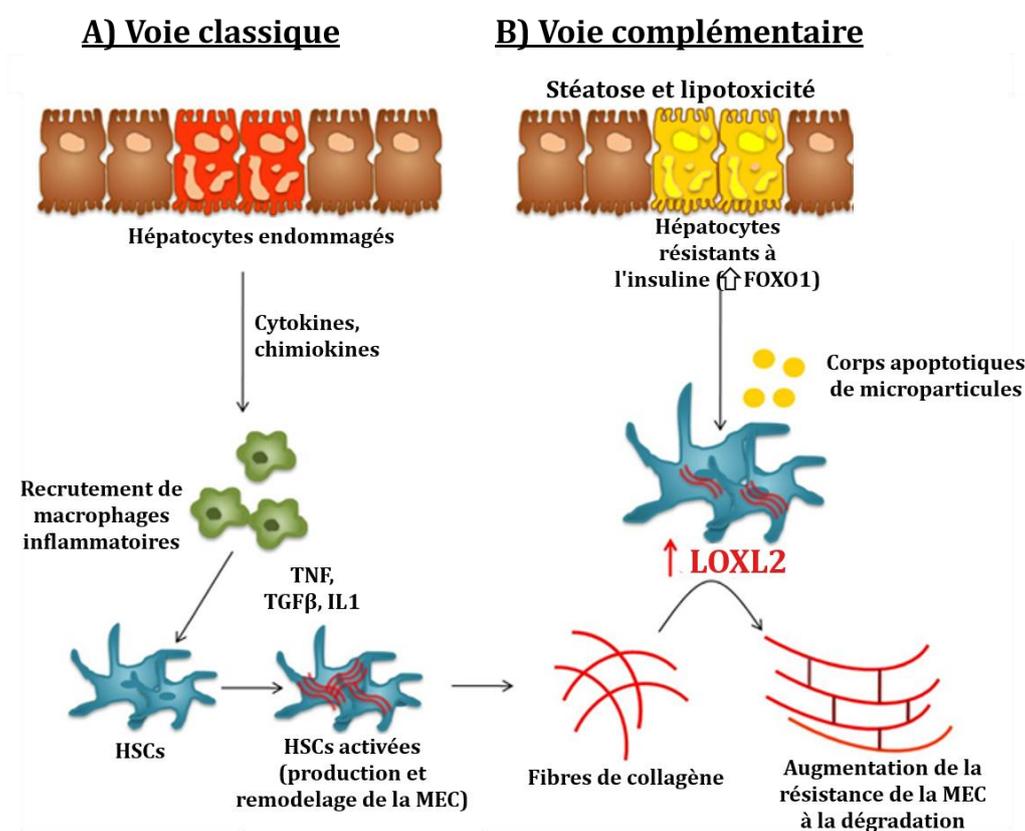


Figure 28 : Mécanisme proposé pour l'augmentation de la rigidité de la MEC induite par LOXL2.

(A) Voie classique d'accumulation de la MEC et de développement de fibrose hépatique impliquant le recrutement de cellules inflammatoires, la sécrétion de cytokines inflammatoires et la transdifférenciation des HSCs. (B) La voie complémentaire de la fibrose impliquant la lipotoxicité accrue des hépatocytes et LOXL2 dans les HSCs, facilitant la stabilisation de la MEC. Image adaptée de (Dongiovanni et al., 2017).

Il a été décrit que l'activité de LOX augmente après une lésion hépatique, elle est multipliée par 30, chez les souris atteintes de fibrose induite par le CCl₄. Cette augmentation est associée à une réticulation accrue de la MEC et une augmentation de la raideur du foie (Perepelyuk et

al., 2013). L'inhibition des LOX par le β -amino-propio-nitrile a diminué le nombre et l'activité des myofibroblastes, entraînant une réduction de la fibrose, dans un modèle de souris atteintes de fibrose hépatique induite par le CCl_4 (Ikenaga et al., 2017; Liu et al., 2016). Cependant, malgré ces résultats prometteurs, les essais cliniques portant sur l'anticorps simtuzumab bloquant LOXL2 chez les patients atteints de NASH, n'ont donné que des résultats décevants sans effet sur la fibrose (Harrison et al., 2018a; Meissner et al., 2016; Muir et al., 2019). Une étude ultérieure a montré qu'il existait une différence entre les isoformes. En effet, aucune augmentation significative de l'activité de LOXL2 n'a été observée après une lésion hépatique précoce, tandis qu'une expression accrue de LOXL1 a été mise en évidence. Ce qui suggère un rôle minime de LOXL2 dans les stades précoces de la maladie. Cette enzyme semble être impliquée plutôt dans la progression de la fibrose que dans son initiation (Perepelyuk et al., 2013). Les études futures devraient répondre à cette observation en ciblant spécifiquement LOX ou LOXL1 (Roehlen et al., 2020).

2.6 Induction de la dégradation de la MEC

Augmenter la dégradation de la matrice cicatricielle, par administration directe de protéases matricielles, par stimulation des cellules qui les produisent, ou encore par régulation négative de leurs inhibiteurs pourrait offrir de nouvelles approches thérapeutiques de la fibrose hépatique. En effet, une thérapie anti-fibrotique doit provoquer la résorption de la matrice existante, en plus d'empêcher le dépôt de nouvelles molécules matricielles (Friedman, 2008b).

La dégradation de la MEC est étroitement liée à la perte de HSCs activées, ce qui entraîne une diminution des niveaux de TIMPs et une augmentation de l'activité des MMPs (Sun and Kisseleva, 2015). Un anticorps ciblant l'inhibiteur TIMP-1, testé sur un modèle préclinique de fibrose hépatique induite par le CCl_4 , a induit une atténuation de la fibrose, une diminution de l'activation des HSCs et une baisse de l'activité de MMP-2 chez les rats traités avec cet anticorps (Parsons et al., 2004). Comme évoqué précédemment, les macrophages réparateurs se sont également révélés essentiels à l'élimination de la MEC, en raison de la sécrétion de MMP fibrolytiques (MMP-12 et 13) et de leur localisation idéale pour moduler la dégradation de la MEC (Jung and Yim, 2017; Zoubek et al., 2017).

En revanche, le remodelage de la MEC peut être limité par la réticulation des fibres de collagène et d'une MEC riche en fibres d'élastine. En effet, la présence d'une forme non clivable de collagène de type I pourrait empêcher la résolution spontanée de la fibrose même après l'arrêt des lésions hépatiques (Issa et al., 2003). De plus, la rigidité de la MEC, et l'augmentation des interactions entre les myofibroblastes et le collagène favorisent l'activation et la survie des myofibroblastes. Cet état physiopathologique peut conduire à un « point de non-retour » pour la fibrose hépatique (Liu et al., 2013).

La réversibilité de la fibrose hépatique offre de nouvelles approches thérapeutiques potentielles. Cependant, de nombreuses questions restent sans réponse. Le mécanisme sous-jacent de l'inactivation des HSCs reste à déterminer. Les facteurs qui déterminent le sort des HSCs activées pendant la régression de la fibrose hépatique sont encore inconnus, de même que le basculement entre les deux phénotypes différents de macrophages (Sun and Kisseleva, 2015).

3. Essais cliniques en cours pour le traitement de la fibrose hépatique

Un obstacle majeur au développement de médicaments pour la fibrose hépatique est la nécessité d'un temps de traitement très long pour démontrer l'efficacité dans les essais cliniques et représente donc un coût très élevé (Douglass et al., 2008a). De nombreuses molécules thérapeutiques ciblant différentes voies métaboliques sont actuellement testées pour le traitement de la fibrose hépatique. A l'heure actuelle, il existe plus de 150 études cliniques en cours pour la NASH. Seuls les principaux essais cliniques seront détaillés ci-dessous.

3.1 Acide norursodésoxycholique (NorUDCA)

L'acide norursodésoxycholique (NorUDCA) est un homologue de l'acide ursodésoxycholique (UDCA), un acide biliaire secondaire, ayant une activité hépato-protectrice, anti-inflammatoire et anti-fibrotique. Une étude clinique de phase 2 a été réalisée afin d'évaluer l'efficacité de deux doses de NorUDCA par rapport au placebo, administrées par voie orale pendant 12 semaines chez 198 patients atteints de NASH. Une réduction dose-dépendante de l'ALAT sérique a été observée à la fin du traitement par NorUDCA. Cette diminution était significative dans le groupe recevant la plus forte dose du traitement avec une bonne tolérance chez les patients (EudraCT 2013-004605-38) (Traussnigg et al., 2019). Un essai de phase 2b évaluant le norUDCA dans la NASH est en cours (EudraCT 2018-003443-31).

3.2 Agonistes de FXR

L'acide obéticholique (OCA), un dérivé de l'acide biliaire, est un puissant agoniste du récepteur farnésioïde X (FXR), un récepteur nucléaire jouant un rôle crucial dans la physiopathologie des maladies du foie en régulant le métabolisme du glucose, des lipides et des acides biliaires. L'efficacité de l'OCA a été évaluée, dans un essai de phase 2, chez 283 patients atteints de NASH, non cirrhotiques, après administration par voie orale pendant 72 semaines entre 2011

et 2012. Cette première étude contrôlée par placebo en double aveugle a montré que l'OCA conduit, chez 45% des patients traités, à une amélioration significative des caractéristiques histologiques, définie comme une diminution du score d'activité de la NASH d'au moins deux points, sans aggravation de la fibrose, entre le début et la fin du traitement. Cependant, 23% des patients traités par l'OCA ont développé un prurit, l'un des principaux effets indésirables de l'OCA (NCT01265498) (Neuschwander-Tetri et al., 2015).

Dans l'étude de phase 3, réalisée entre 2015 et 2018 sur 931 patients ayant une NASH prouvée histologiquement, deux doses de l'OCA ont été évaluées, 10 mg et 25 mg. La résolution de la NASH n'était pas significative. Cependant, une régression de la fibrose hépatique était observée chez 18% et 23% des patients traités par l'OCA à 10 mg et 25 mg, respectivement, contre 12 % dans le groupe placebo. Il est important de noter que le pourcentage de patients se plaignant de prurit était de 51% dans le groupe OCA 25 mg entraînant un arrêt du traitement chez 9 % d'entre eux (NCT02548351) (Younossi et al., 2019).

Un deuxième effet indésirable de l'OCA est l'augmentation des taux de LDL, ce qui est problématique chez des patients atteints de NASH, qui présentent un risque élevé de développer une maladie cardiovasculaire. Une récente étude de phase 2 randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo, a évalué la combinaison de l'OCA avec des statines chez des patients atteints de NASH, dès la quatrième semaine de traitement par l'OCA. Les résultats ont montré que l'augmentation du cholestérol LDL induite par l'OCA, dès la quatrième semaine de traitement, pouvait être facilement atténuée par l'atorvastatine à 10 mg (NCT02633956) (Pockros et al., 2019).

D'autres agonistes de FXR, non acides biliaires, qui devraient induire moins d'effets indésirables, sont actuellement évalués dans la NASH, notamment le Cilofexor (ou GS-9674) (NCT02854605), l'EDP-305 (NCT03421431), ou le Tropifexor TXR (ou LJM-452) (NCT02855164). Le Tropifexor a été évalué dans un essai clinique de phase 2, sur 198 patients atteints de NASH, ayant suivi le traitement pendant 12 semaines. Une diminution de l'ALAT et une bonne tolérance chez les patients sans effets secondaires prononcés ont été obtenues (Sanyal et al., 2019).

Le NGM282 est un analogue du facteur de croissance des fibroblastes FGF-19, une hormone induite par FXR, qui régule la synthèse des acides biliaires et l'homéostasie du glucose. L'efficacité et l'innocuité du NGM282 ont été évaluées lors de l'essai de phase 2, entre 2015 et 2016, sur 82 patients recevant NGM282 à 3 mg ou 6 mg, ou un placebo en sous-cutané. Après 12 semaines de traitement, 74% des patients recevant une dose de 3 mg, et 79% de ceux recevant une dose de 6 mg, ont présenté une réduction significative d'au moins 5% de la teneur absolue en graisse hépatique, par rapport à la valeur initiale, avec un profil de

sécurité acceptable, contre 7% dans le groupe placebo (NCT02443116) (Harrison et al., 2018b). Cependant, il n'a pas été décrit si une amélioration histologique accompagnait ces changements. Pour répondre à cette question, une deuxième étude a été réalisée, sur 43 patients atteints de NASH confirmée par biopsie recevant NGM282 à une dose de 1 mg ou 3 mg en sous-cutané. À la semaine 12, le traitement par NGM282 a entraîné une réduction significative du score d'activité de la NASH, de la teneur en graisse hépatique, accompagnée d'une amélioration des marqueurs sériques de la fibrose. Parmi les patients recevant NGM282 à 1 mg ou 3 mg, 25% et 42%, respectivement, présentaient une amélioration de la fibrose hépatique d'un stade ou plus, sans aggravation de la NASH (Harrison et al., 2020a). Comme l'OCA, NGM282 induit une augmentation du taux de LDL, qui peut également être atténuée par l'ajout de statine (Rinella et al., 2019).

3.3 Agonistes de PPAR

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) sont une autre famille de récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme des maladies du foie. Plusieurs agonistes de PPAR ont été évalués, et sont actuellement en phase 2 pour le traitement de la NASH, notamment Seladelpar (NCT03551522); Lanifibranor (NCT03008070, NCT03459079); Saroglitazar (NCT03863574, NCT03061721, NCT03617263, NCT03639623).

Elafibranor est un agoniste de PPAR α / δ qui a été évalué dans un essai contrôlé randomisé international de phase 2 incluant 276 patients NASH non cirrhotiques, recevant Elafibranor à 80 mg ou 120 mg, ou un placebo pendant 52 semaines. Elafibranor à 120 mg/jour a induit une atténuation de la NASH sans aggravation de la fibrose, chez 19% des patients contre 12% dans le groupe placebo. Chez les répondeurs, une réduction du stade de fibrose a été observée contre une augmentation chez les non répondeurs. Les enzymes hépatiques, les lipides, les profils de glucose et les marqueurs de l'inflammation systémique ont été significativement réduits dans le groupe Elafibranor à 120 mg, par rapport au groupe placebo. Elafibranor a été bien toléré et a amélioré le profil de risque cardio-métabolique des patients (NCT01694849) (Ratziu et al., 2016). Une étude de phase 3 a été menée par Genfit, afin d'évaluer l'efficacité d'une administration quotidienne d'Elafibranor à 120 mg, sur 1070 patients atteints de NASH et de fibrose au stade 2 ou 3. Récemment (Mai 2020), les résultats de l'analyse intermédiaires de phase 3 à la 72^{ème} semaine de traitement ont été publiés. Les données de sécurité et de tolérabilité d'Elafibranor concordent avec celles des études précédemment menées. Cependant, les résultats de l'évaluation d'efficacité étaient très décevants. L'essai n'a pas atteint les critères d'évaluation principal (résolution de la NASH sans aggravation de la fibrose) et secondaire (l'amélioration de la fibrose d'au moins un stade) et n'a montré aucune différence significative par rapport au placebo (Genfit, 2020).

3.4 Agents ciblant le métabolisme lipidique

Le firsocostat (GS-0976), un inhibiteur de l'acétyl-CoA carboxylase, une enzyme clé dans la lipogenèse *de novo*, a été évalué dans un essai de phase 2 chez des patients atteints de NASH pendant 12 semaines. Une réduction de la stéatose, évaluée par IRM, et de la rigidité du foie évaluée par élastographie, a été observée, accompagnée par une diminution des marqueurs de lésions hépatiques, notamment TIMP-1, des taux sériques d'ALAT, et la teneur en lipides hépatiques (NCT02856555) (Lawitz et al., 2018). Dans un autre essai randomisé contrôlé contre placebo de 126 patients atteints de NASH, l'administration de GS-0976 à 20 mg pendant 20 semaines, a réduit la stéatose hépatique d'au moins 30% chez 48% de patients contre 15% du groupe placebo. Une diminution dose-dépendante de certains marqueurs de fibrose tels que TIMP-1 a été observée. Comme pour les traitements cités précédemment, une élévation des taux sériques de triglycérides a également été observée, mais qui est sensible aux statines (NCT02856555) (Loomba et al., 2018a).

L'aramchol est un conjugué d'acide gras et d'acide biliaire qui inhibe le stéaroyl coenzyme A désaturase 1 (SCD-1), une enzyme clé de la lipogenèse. Dans une étude de phase 2b réalisée contre placebo, Aramchol a induit une réduction de la graisse hépatique, une diminution des ALAT et ASAT, une résolution de la NASH sans aggravation de la fibrose et une réduction du stade de fibrose sans aggravation de la NASH. Aramchol a également fait preuve d'excellents profils de sécurité et de tolérance (Ratziu et al., 2018). Il est actuellement évalué dans un essai de phase 3 pour des patients NASH, y compris des patients cirrhotiques (NCT02279524).

3.5 Thérapies antidiabétiques

Étant donné que de nombreux patients atteints de NASH présentent également un diabète de type 2, et que ce dernier est associé à un risque accru de progression de la fibrose hépatique (et un risque plus élevé de CHC) dans la NASH, les thérapies antidiabétiques ont une justification solide pour leur utilisation dans les essais cliniques pour le traitement de la fibrose hépatique (Lemoine and Friedman, 2019).

L'efficacité du liraglutide, un agoniste du peptide 1 de type glucagon GLP-1, a été évaluée dans une étude de phase 2, chez 52 patients atteints de NASH. Après 48 semaines de traitement, 39% des patients ayant reçu du liraglutide, en sous-cutané, présentaient une résolution de la NASH sans aggravation de la fibrose contre 9% dans le groupe placebo (NCT01237119) (Armstrong et al., 2016). Le sémaglutide, un autre agoniste du GLP-1, a induit une réduction des taux d'ALAT chez les patients diabétiques de type 2 (Newsome et al., 2019).

La pioglitazone, a été évaluée dans un essai clinique de phase 2 pour la NASH, et a induit une réduction d'au moins 2 points du score d'activité de la NASH sans aggravation de la fibrose

chez 58% des patients et une résolution de la NASH pour 51% d'entre eux. Le traitement par la pioglitazone a également induit une amélioration du score de fibrose, une réduction de la teneur en triglycérides hépatiques de 19% à 7%, respectivement, et une amélioration significative de la sensibilité du tissu adipeux, hépatique et musculaire à l'insuline. Toutes les améliorations métaboliques et histologiques observées à 18 mois ont persisté pendant 36 mois de traitement. Aucune différence d'événements indésirables entre les groupes n'a été observée (Cusi et al., 2016).

Une autre étude a été réalisée sur des adultes atteints de NASH prouvée par biopsie (52 atteints de diabète de type 2 et 49 atteints de prédiabète), recevant de la pioglitazone ou un placebo pendant 18 mois. Une réduction du score d'activité de la NASH, sans aggravation de la fibrose, a été observée chez 48% des patients atteints de diabète de type 2 contre 46% sans diabète, ce qui montre l'efficacité de la pioglitazone chez les patients atteints ou non de diabète de type 2. Cependant, une réduction significative de la fibrose n'a été observée que chez les patients atteints de diabète de type 2. Une augmentation de la sensibilité du tissu adipeux à l'insuline était plus importante chez les patients atteints de diabète de type 2 que chez les patients atteints de prédiabète. D'autres études sont nécessaires pour déterminer les mécanismes par lesquels la pioglitazone réduit les maladies du foie chez les patients atteints de diabète de type 2 (NCT00994682) (Bril et al., 2018).

L'effet de la canagliflozine, un inhibiteur du co-transporteur sodium-glucose 2 (SGLT2), sur la fonction hépatique, a été étudié chez des patients atteints de diabète type 2 avec une NASH confirmée par biopsie (fibrose hépatique stade 1–3). Après 12 semaines de traitement, une réduction des marqueurs de la fibrose hépatique tels que les taux sériques d'ALAT et d'ASAT a été observée. Une amélioration significative des marqueurs de la fonction hépatique ainsi que des paramètres métaboliques, a été mise en évidence. Aucun événement indésirable grave ou lié au foie n'a été signalé, des essais plus importants sont prévus (Seko et al., 2018).

3.6 Traitements ciblant l'inflammation et l'apoptose

Au cours de la NASH, l'apoptose des hépatocytes entraîne une accumulation de cellules inflammatoires. Les caspases jouent un rôle central dans l'apoptose, l'inflammation et la fibrose, en produisant des microparticules pro-inflammatoires hémodynamiquement actives, qui provoquent une inflammation intrahépatique.

Une étude contrôlée de phase 2 contre placebo a évalué l'efficacité, l'innocuité et la tolérance de l'Emricasan, un pan-inhibiteur de caspase, chez des sujets atteints de NAFLD non cirrhotiques et ayant des niveaux d'ALAT élevés. Après 28 jours de traitement, les taux sériques d'ALAT, de cytokératine-18, de cytokératine-18 clivée et de caspase 3/7 ont diminué,

de manière significative, montrant la diminution de l'apoptose des hépatocytes, chez les sujets traités par l'Emricasan en comparaison des patients recevant le placebo (NCT02077374) (Shiffman et al., 2019). L'Emricasan a également induit un effet anti-inflammatoire intrahépatique et une diminution des taux d'ALAT et d'ASAT, chez des patients atteints de cirrhose compensée, causée par la NASH ou l'hépatite C (Garcia-Tsao et al., 2019). Une autre étude de phase 2 sur 86 patients atteints de cirrhose (associée à l'alcool, au VHC ou à la NASH) a évalué l'effet de l'Emricasan pendant trois mois de traitement. Une amélioration de la fonction hépatique, accompagnée d'une diminution significative des taux sériques de cytokératine 18 et de caspase 3/7, a été observée dans le groupe Emricasan en comparaison du groupe placebo (NCT02230670) (Frenette et al., 2019). Plusieurs essais de phase 2 ont donc été lancés pour évaluer l'efficacité de l'Emricasan dans la NASH (NCT02077374, NCT02686762, NCT02960204, NCT03205345). Cependant, les résultats de l'évaluation clinique publiés récemment étaient très décevants et n'ont montré aucune amélioration histologique du foie des patients NASH atteints de fibrose (stade F1-F3). En effet, l'inhibition de la caspase réduit le taux sérique d'ALAT à court terme, mais peut diriger les cellules vers des mécanismes alternatifs de mort cellulaire notamment la nécropotose entraînant une aggravation de la fibrose hépatique et de la bllonisation hépatocytaire chez les patients traités par l'Emricasan pendant 6 mois (Harrison et al., 2020b).

Le sélonsertib, un inhibiteur sélectif de la kinase 1 régulatrice du signal d'apoptose (ASK1), a été évalué seul ou en association avec le simtuzumab (bloquant LOXL2), dans un essai de phase 2 incluant 72 patients atteints de NASH et de fibrose hépatique au stade 2 ou 3. Le simtuzumab seul n'ayant eu aucun effet sur l'histologie hépatique, les patients traités par le simtuzumab seul ont été évalués en tant que groupe placebo. Après 24 semaines de traitement, une amélioration de la fibrose hépatique a été constatée, associée à une réduction de la raideur hépatique, évaluée par élastographie par résonance magnétique, de la teneur en collagène et de l'inflammation lobulaire sur les biopsies hépatiques, ainsi qu'une amélioration des biomarqueurs sériques de l'apoptose et de la nécrose. Il n'y avait aucune différence significative dans les événements indésirables entre les groupes de traitement (Loomba et al., 2018b). Deux grands essais de phase 3 ont été menés chez des patients NASH atteints de fibrose avancée (NCT03053050) ou de cirrhose (NCT03053063) pour évaluer le sélonsertib.

Le cénicriviroc, un double antagoniste des récepteurs de chimiokine (CCR2/CCR5), ayant des effets anti-inflammatoires, a été évalué pour le traitement de la NASH avec fibrose hépatique (stades 1 à 3), dans une étude de phase 2b sur des patients traités pendant un an par le cénicriviroc ou un placebo. Une diminution significative de la fibrose hépatique sans aggravation de la NASH a été constatée dans le groupe cénicriviroc en comparaison du groupe placebo. Cette amélioration était plus importante chez les patients dont l'activité de la maladie

et le stade de fibrose étaient plus élevés au départ. Les biomarqueurs de l'inflammation ont été réduits, et la sécurité et la tolérance étaient comparables à celles du placebo (NCT02217475) (Friedman et al., 2018b). L'étude de phase 2 a maintenant été étendue en tant qu'essai ouvert (NCT03059446), et un essai de phase 3 (NCT03028740) est actuellement en cours pour des patients NASH présentant une fibrose hépatique significative, mais pas de cirrhose.

3.7 Traitements ciblant la fibrose

Un essai de phase 2b a été réalisé chez 219 patients atteints de NASH avec une fibrose avancée recevant des injections sous-cutanées hebdomadaires de simtuzumab (bloquant LOXL2) pour une durée prévue de 240 semaines. L'étude a été arrêtée après la semaine 96, en raison d'un manque d'efficacité. Le simtuzumab n'a pas induit de réduction significative de la teneur en collagène hépatique, ni du stade de la fibrose par rapport au groupe placebo (NCT01672866) (Harrison et al., 2018a).

Le GR-MD-02 est un inhibiteur de la galectine-3, une protéine impliquée dans la fibrogénèse, en se liant aux oligosaccharides associés aux glycoprotéines. Le GR-MD-02, évalué chez des sujets atteints de NASH avec fibrose hépatique, serait sans danger pour les patients et il a pu améliorer les biomarqueurs de la fibrose hépatique (Harrison et al., 2016). Néanmoins, deux essais différents de phase 2 évaluant l'efficacité du GR-MD-02 dans la NASH étaient négatifs. Dans l'essai de phase 2 incluant 30 patients NASH atteints de fibrose avancée (NCT02421094), GR-MD-02 n'a induit aucun effet significatif sur les biomarqueurs non invasifs, de l'inflammation ou de la fibrose hépatique, sur une période de 4 mois (Harrison et al., 2018c). Dans l'essai de phase 2 incluant 162 patients NASH atteints de cirrhose et d'hypertension portale (NCT02462967), GR-MD-02 a amélioré la ballonnisation des hépatocytes mais pas la fibrose hépatique ni l'hypertension portale (Chalasani et al., 2018).

Une autre stratégie pour moduler la fibrose hépatique consiste à inhiber les intégrines, les récepteurs régulant les interactions entre les cellules et la MEC, et contribuant dans certains tissus à l'activation du TGF- β 1. GSK3008348, un inhibiteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_6$, qui était bien toléré chez les participants sains (NCT02612051) (Maden et al., 2018), est actuellement évalué dans la fibrose pulmonaire et, sur la base de ces résultats, pourrait être un candidat pour le traitement de la fibrose hépatique (Lemoine and Friedman, 2019).

Un seul essai clinique, utilisant des siRNA pour le traitement de la fibrose est actuellement en cours pour évaluer l'efficacité de nanoparticules lipidiques couplées à la vitamine A et contenant des siRNA spécifiques de HSP47 sur des patients ayant une fibrose hépatique modérée. Cette protéine de choc thermique de 47 kDa ou HSP47, est une protéine

chaperonne spécifique du collagène chez l'humain. C'est un médiateur dans la production du collagène, qui assure la formation de la triple hélice α du procollagène dans le réticulum endoplasmique pour faciliter sa sécrétion (Nagata, 1998; Sato et al., 2008a). Cette molécule candidat, ND-L02-S0201, développée en partenariat entre Bristol-Myers Squibb et Nitto Denko, a présenté une bonne tolérance dans les premières phases de l'essai clinique (NCT02227459).

L'activité anti-fibrotique de nombreux candidats médicaments a été démontrée *in vitro* et dans des modèles animaux, confirmant que la fibrose peut régresser, même lorsque la maladie sous-jacente n'est pas guérie. Cependant, l'efficacité globale de la plupart d'entre eux, dans les essais cliniques, a été étonnamment modeste, avec seulement une minorité de patients présentant une réponse au traitement, et des résultats largement décevants des essais cliniques de phases 2 et 3. Bien que certains candidats médicaments ont démontré une amélioration de la stéatose ou de l'inflammation, leur effet sur la fibrose était soit non significatif, soit accompagné d'effets indésirables entraînant l'arrêt du traitement (Tableau 4). Par conséquent, aucun candidat anti-fibrotique, à l'heure actuelle, n'a été approuvé en clinique.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer cet échec en clinique. Tout d'abord, la fibrose hépatique résulte d'une interaction complexe entre la lésion hépatocellulaire et la réaction inflammatoire conduisant à l'activation des HSCs et à la production de la MEC (Zoubek et al., 2017). Cependant, les modèles conventionnels *in vitro* de la fibrose hépatique ne reproduisent pas parfaitement l'évolution multicellulaire et multidirectionnelle de la fibrose chez l'humain (Roehlen et al., 2020). De plus, les candidats thérapeutiques sont généralement testés sur des modèles animaux tels que le modèle CCl₄ ou BDL qui ne reflètent que partiellement la maladie humaine. Par conséquent, il a été proposé d'évaluer les candidats-médicaments anti-fibrotiques, en préclinique, dans deux à trois modèles de fibrose validés et complémentaires avant de les tester en clinique (Schuppan et al., 2018; Torok et al., 2015). En outre, l'utilisation de nouveaux modèles de fibrose hépatique, qui prennent en compte la physiopathologie complexe de la maladie, pourrait également faire progresser le développement de composés anti-fibrotiques à l'avenir (Roehlen et al., 2020). Un autre facteur à prendre en considération est l'absence de biomarqueurs non invasifs robustes. En effet, l'évaluation de l'efficacité des candidats anti-fibrotiques dans les essais cliniques nécessite de réaliser un acte invasif : la biopsie hépatique. Outre ses limites décrites dans le premier chapitre, cette technique ne permet pas d'obtenir des données intermédiaires en cours d'essai clinique. De plus, les

biomarqueurs non invasifs actuels ne donnent pas de résultats aussi robustes que la biopsie hépatique. Ainsi, il est très utile de développer de nouveaux biomarqueurs qui soient en corrélation avec l'histologie et qui permettront d'obtenir des preuves précoces de l'efficacité du médicament. Cela favoriserait une évaluation plus rapide des effets des candidats anti-fibrotiques, et pourrait raccourcir le chemin vers l'approbation des médicaments pour la fibrose (Friedman, 2015). Enfin, la courte durée des essais, empêche toute conclusion sur l'efficacité et l'innocuité à long terme des traitements proposés. Ces essais ne permettent pas de savoir si l'amélioration histologique et métabolique observée se traduira par un bénéfice clinique en termes de morbidité et de mortalité hépatiques (Musso et al., 2010).

Mécanisme anti-fibrotique	Agent	Raisonnement	Mode d'action moléculaire dans les études précliniques	Résultats clés des essais cliniques
Inhibition de l'apoptose des hépatocytes	Pan-inhibiteur de caspase Emricasan	L'apoptose hépatocytaire induit l'inflammation et l'activation des HSCs	Diminution de l'activation des HSCs et amélioration de la fonction hépatique chez le rat traité au CCl ₄ (Gracia-Sancho et al., 2019)	Phase 2 : Amélioration de l'inflammation ou de la fibrose hépatique et de la tendance à l'aggravation de la ballonnisation des hépatocytes chez les patients NASH atteints de fibrose F1-F3 (Harrison et al., 2020b). Petit effet réducteur sur HVPG chez les patients NASH cirrhotiques (Gracia-Sancho et al., 2019)
	Inhibiteur d'ASK1, Sélonsertib	Modulation de l'apoptose des hépatocytes <i>via</i> l'activation de JNK et p38 MAP kinases	Amélioration de la stéatose et de la fibrose dans le modèle de souris NASH (Budás et al., 2016)	Phase 2 : Amélioration du degré histologique de fibrose chez les patients atteints de NASH F2-3 (Loomba et al., 2018b). Diminution de la raideur hépatique par ERM et amélioration des marqueurs non invasifs de fibrose et d'inflammation (Loomba et al., 2017) Phase 3 : évaluation en cours de Sélonsertib chez les patients NASH atteints de fibrose avancée ou de cirrhose (NCT03053050; NCT03053063)
Réduction du stress oxydatif	Antioxydant naturel avec plusieurs cibles, Resvératrol	Activité anti-inflammatoire et antioxydante	Le resvératrol réduit l'inflammation, la fibrose (Kessoku et al., 2016) et la stéatose (Nishikawa et al., 2015) dans un modèle murin de NASH	Phase 2 : effets protecteurs significatifs de resvératrol sur les marqueurs de l'inflammation hépatique et du grade de stéatose hépatique dans les 12 semaines de traitement, aucun effet sur la fibrose (Faghihzadeh et al., 2014)
	Double inhibiteur NOX1 / 4, GKT137831	Activation des HSCs (NOX1) et induction de l'apoptose des hépatocytes (NOX4) par production de radicaux superoxyde	Effet anti-fibrotique dans les modèles murins CCl ₄ et BDL <i>via</i> la suppression de la production de ROS dans les HSCs <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> (Aoyama et al., 2012)	Phase 2 : effets significatifs sur les paramètres sérologiques de cholestase après 6 semaines de traitement de PBC. Étude en cours (NCT03226067)

Inhibition de l'activation des HSCs	Agoniste de FXR, acide obéticholique (OCA)	Régulation transcriptionnelle des gènes pro-fibrogéniques dans les HSCs. Amélioration de la barrière muqueuse intestinale et homéostasie de l'axe intestin-foie	Régulation négative de la synthèse du collagène 1 dans les HSCs, effet anti-fibrotique puissant dans les modèles animaux de fibrose hépatique (Fiorucci et al., 2004)	Phase 2 : Amélioration de la fibrose après 72 semaines de traitement par OCA (Neuschwander-Tetri et al., 2015) Phase 3 : amélioration de la fibrose dose-dépendante chez 23% des patients traités par OCA à 25 mg contre 12% des participants sous placebo. Réduction de l'inflammation et de la ballonisation hépatocellulaire (Younossi et al., 2019) mais augmentation des effets indésirables (NCT02548351)
	Petite molécule Inhibiteur de CBP / β-caténine, PRI-724	Implication de la signalisation Wnt / β -caténine dans l'activation des HSCs et la fibrose hépatique	Inhibition de l'activation des HSCs chez les souris transgéniques VHC+ ainsi que de la fibrose hépatique dans le modèle murin CCl ₄ (Tokunaga et al., 2017). Effets bénéfiques sur la résolution de la fibrose en activant des sous-populations de macrophages anti-fibrotiques (Osawa et al., 2015). Diminution de l'apoptose des hépatocytes ainsi que le degré de fibrose dans le modèle de souris NASH (Osawa et al., 2018)	Phase 1 : amélioration histologique dose-dépendante (diminution > 2 points du score d'index d'activité histologique) chez 3/12 patients, mais détérioration de 2 points chez 2/12 patients avec cirrhose associée au VHC (Kimura et al., 2017) Phase 2 : PRI-724 chez les patients atteints de cirrhose hépatique liée à l'hépatite B ou C en cours (NCT03620474)
Réduction de l'évolution et de la contractilité des septa fibreux	Nanoparticule lipidique contenant un siRNA anti-HSP47, BMS 986263	Rôle de HSP47 comme protéine chaperonne pour la formation de collagène de type 1.	Effets anti-fibrotiques significatifs dans 3 modèles <i>in vivo</i> de fibrose hépatique (Sato et al., 2008b)	Phase 1b / 2 : étude ouverte d'escalade de dose de BMS 986 263 chez des patients atteints de fibrose modérée à sévère : terminée, pas encore publiée (NCT02227459)
	Anticorps monoclonal spécifique de LOXL2, AB0023 (Simtuzumab)	Contribution de LOXL2 à la rigidité de la MEC et des fibres de collagène Implication dans l'expression du collagène de type 3, et la sensibilité au PDGFR	Activité anti-fibrotique puissante dans le modèle murin de fibrose hépatique <i>via</i> l'inhibition de la réticulation du collagène et son effet d'activation en aval sur la signalisation TGF- β 1 qui contribue à la stimulation des myofibroblastes (Barry-Hamilton et al., 2010)	Phase 2 : Aucun effet sur la fibrose chez les patients NASH, ou infectés par le VIH et/ou le VHC et atteints de fibrose hépatique (Harrison et al., 2018a; Meissner et al., 2016; Muir et al., 2019)

Modulation immunitaire	Inhibiteur de CCR2 / CCR5, Cenicriviroc	Recrutement de monocytes et de macrophages modulés par CCR2 / CCR5 pendant la réponse pro-fibrogénique précoce	Diminution dose-dépendante du recrutement des monocytes / macrophages (Lefebvre et al., 2016; Mossanen et al., 2016; Puengel et al., 2016). Diminution significative de l'inflammation lobulaire, de la ballonisation hépatocellulaire ainsi que de l'expression du collagène 1 et de α -SMA dans le modèle de souris NASH (Lefebvre et al., 2016)	Phase 2 : amélioration du stade de fibrose (> 1 stade) sans aggravation de la NASH, en particulier chez les patients présentant une activité élevée de la maladie (NAS > 5, ballonisation importante des hépatocytes, fibrose F2-F3) (Friedman et al., 2018b). Aucun effet sur l'inflammation lobulaire, mais diminution des marqueurs sérologiques de l'inflammation systémique (Friedman et al., 2018b) Phase 3 : en cours, patients NASH atteints de fibrose (NCT03028740)
	Inhibiteur de la galectine-3, Belaepectin	Fonction de la galectine-3 comme chimioattractant pour les macrophages et les monocytes, accélérant ainsi davantage les réponses immunitaires pro-inflammatoires et pro-fibrogènes. Activateur de MMP-2 et MMP-9	Réduction dose-dépendante du NAS, de la fibrose et de la pression portale dans les modèles murins et rat de NASH potentiellement en raison d'un impact sur la polarisation des macrophages et d'une activation réduite des HSCs (Traber and Zomer, 2013; Traber et al., 2013)	Phase 2 : Aucun effet sur la fibrose après 52 semaines de traitement chez les patients NASH. Effets protecteurs significatifs sur le gonflement des hépatocytes ainsi que sur le développement significatif de HPVG et de varices dans un sous-groupe de patients atteints de cirrhose NASH (Chalasan et al., 2020)

Tableau 4 : Exemples d'essais cliniques pour le traitement de la fibrose hépatique.

Quelques exemples de composés en développement clinique pour le traitement de la fibrose hépatique ciblant différentes voies : par inhibition de l'apoptose hépatocytaire, par réduction du stress oxydatif, par inhibition de l'activation des HSCs, par réduction de l'évolution et de la contractilité des septa fibreux, ou par modulation immunitaire. Abréviations : ERM : Elastographie par résonance magnétique, HPVG : Gradient de pression veineuse hépatique, PBC : Cirrhose biliaire primitive, CBP : *CREB binding protein*. Adapté de (Roehlen et al., 2020).

Pour conclure, les études précliniques et cliniques ont montré que la fibrose hépatique et même la cirrhose sont potentiellement réversibles. L'élimination de l'agent causal de la maladie hépatique peut ralentir ou inverser la fibrose hépatique, mais survient généralement trop lentement pour éviter les complications potentielles, en particulier dans les stades avancés de la maladie. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie de la fibrose a permis d'accélérer le développement de nouvelles stratégies anti-fibrotiques, qui sont actuellement testées dans des essais cliniques, en particulier pour le traitement de la NASH. Ces candidats-médicaments ciblent différentes voies responsables de l'apparition et/ou de la progression des lésions hépatiques chroniques, comme le métabolisme du glucose, des lipides et des acides biliaires, l'apoptose, l'inflammation et la fibrose. Le développement d'un médicament anti-fibrotique efficace aurait un impact majeur sur la santé mondiale et pourrait également réduire l'incidence croissante du carcinome hépatocellulaire (Lemoinne and Friedman, 2019).

Chapitre III : l'ARN interférence

1. La découverte de l'ARN interférence

L'ARN interférence (ARNi) est un mécanisme par lequel un petit ARN double brin (ARNdb) peut inhiber, de manière spécifique, l'expression d'un gène. Ce processus peut être induit de manière endogène par le biais de microARN (miRNA) ou introduit de manière exogène par le biais de petits ARN interférents (siRNA) (de Fougérolles, 2008; Refaat et al., 2016). L'ARNi a été observé pour la première fois chez le nématode *Caenorhabditis elegans* par Fire et Mello en 1998. Leurs travaux, publiés dans la revue *Nature*, ont montré que l'introduction expérimentale d'un ARNdb, de grande taille, dont l'un des deux brins possédait une séquence complémentaire au transcrite d'ARNm ciblé, induisait une répression puissante et spécifique de l'expression de ce gène (Fire et al., 1998). Cette découverte a été récompensée par le prix Nobel de médecine et de physiologie en 2006, qui a été remis aux deux chercheurs américains, Andrew Fire et Craig Mello. En 2001, une étude réalisée par Elbashir et al. a montré que des siRNA pouvaient inhiber, de manière spécifique, l'expression de leurs gènes cibles dans différentes lignées cellulaires de mammifères, sans déclencher de réponse non spécifique (Elbashir et al., 2001). Par la suite, l'inhibition de l'expression génique *via* des siRNA synthétiques a été mise en évidence *in vivo*, pour la première fois, chez la souris adulte, en ciblant un ARN pathogène du VHC, exprimé chez la souris, démontrant le potentiel thérapeutique des siRNA (McCaffrey et al., 2003). Les travaux qui ont suivi ont démontré que ce mécanisme de régulation de l'expression génique existe aussi bien chez les plantes que chez les animaux et les humains. L'ARN interférence est devenue une méthode essentielle pour l'étude des gènes et de leurs fonctions, mais également une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de nombreuses maladies humaines (Kim and Rossi, 2008; Okumura et al., 2008; Refaat et al., 2016).

2. Le mécanisme de l'ARN interférence

Le mécanisme d'interférence commence par la reconnaissance de longs ARNdb par une enzyme de type RNase III, appelée Dicer, entraînant leur clivage en de plus petits fragments d'ARNdb d'une longueur de 21 nucléotides. Les 2 nucléotides à chacune des extrémités 3' ne sont pas appariés. Un siRNA peut également être synthétisé chimiquement et introduit dans la cellule, de manière exogène. Les siRNA sont ensuite pris en charge par un complexe ribonucléoprotéique appelé RISC (*RNA-induced silencing complex*) contenant la protéine Argonaute-2 (Ago-2), qui sépare le siRNA en deux ARN simple brin et clive le brin sens. Ce

clivage conduit à une forme activée de RISC avec une molécule d'ARN "guide" simple brin qui possède une région essentielle, appelée « *seed region* », permettant de diriger le complexe effecteur vers l'ARNm cible. C'est cette étape qui permet la spécificité du mécanisme d'ARN interférence grâce à la reconnaissance spécifique entre l'ARNm et le brin guide du siRNA qui se fait par complémentarité de leurs séquences. La protéine Ago-2 a été identifiée comme étant responsable du clivage de l'ARNm cible, entraînant sa dégradation par les RNases ou l'inhibition de sa traduction. Le complexe RISC activé est ensuite recyclé et participe à plusieurs processus catalytiques. L'inhibition de l'expression du gène cible dure généralement de cinq à sept jours, à la fois *in vitro* et *in vivo*. La durée d'action d'un siRNA dépend probablement de nombreux facteurs, tels que l'organe cible, le gène cible et l'espèce (Kim and Rossi, 2008; Kurreck, 2009; Refaat et al., 2016).

2.1 Les siRNA et les shRNA

Il existe 2 approches principales pour l'administration des petits ARNdb. L'approche la plus simple est basée sur les siRNA synthétiques administrés *via* divers vecteurs, directement dans le cytosol des cellules cibles, sous forme de duplex de 19 à 21 pb de longueur (Figure 29). Bien que les siRNA soient faciles à utiliser et produisent souvent un effet inhibiteur important, leur action, dans les cellules de mammifères est transitoire et est limitée par le taux de division cellulaire. Les siRNA se dégradent et se diluent progressivement à mesure que les cellules se divisent. Par conséquent, la persistance de l'activité inhibitrice varie avec le statut prolifératif des cellules.

En 2002, plusieurs groupes de recherche ont développé simultanément des systèmes d'expression dans lesquels le siRNA est généré en continu dans les cellules. Cette deuxième approche est basée sur l'administration aux cellules de systèmes de plasmides et de vecteurs viraux, contenant des cassettes d'expression codant des ARN courts en épingle à cheveux (*short hairpin*, shRNA). Ces derniers sont transcrits par l'ARN polymérase III, et sont ensuite transformés en siRNA par la machinerie cellulaire (Figure 29). Dans la cellule, les shRNA sont traités de manière similaire aux voies de maturation des microARN. Les shRNA se composent de deux séquences d'ARN complémentaires, de 19 à 22 pb, liées par une courte boucle de 4 à 11 nucléotides. Le shRNA est d'abord coupé par Dicer puis rejoint la voie des siRNA. Cette approche permet une expression intracellulaire stable des shRNA, et est particulièrement indiquée pour les applications qui nécessitent une extinction à long terme de l'expression du gène cible. En principe, un traitement unique par des shRNA serait suffisant pour obtenir un effet thérapeutique significatif. Cependant, l'utilisation de cette stratégie présente plusieurs défis, notamment le contrôle précis des concentrations de shRNA au niveau intracellulaire, ainsi que la capacité de stopper sa production lorsque le traitement n'est plus nécessaire. Pour

cela, des systèmes de désactivation inductibles peuvent être utilisés. Un autre problème associé à l'utilisation des shRNA est l'insertion de la séquence administrée dans le génome si le vecteur viral est insertionnel.

Bien que le siRNA et le shRNA utilisent finalement un mécanisme cellulaire similaire (RISC), le choix de la méthode à utiliser dépend de plusieurs facteurs tels que le type cellulaire, les exigences de temps et le besoin d'une expression transitoire ou stable (Fewell and Schmitt, 2006; Kim and Rossi, 2008; Kurreck, 2009; Moore et al., 2010; Rao et al., 2009; Rhinn et al., 2009).

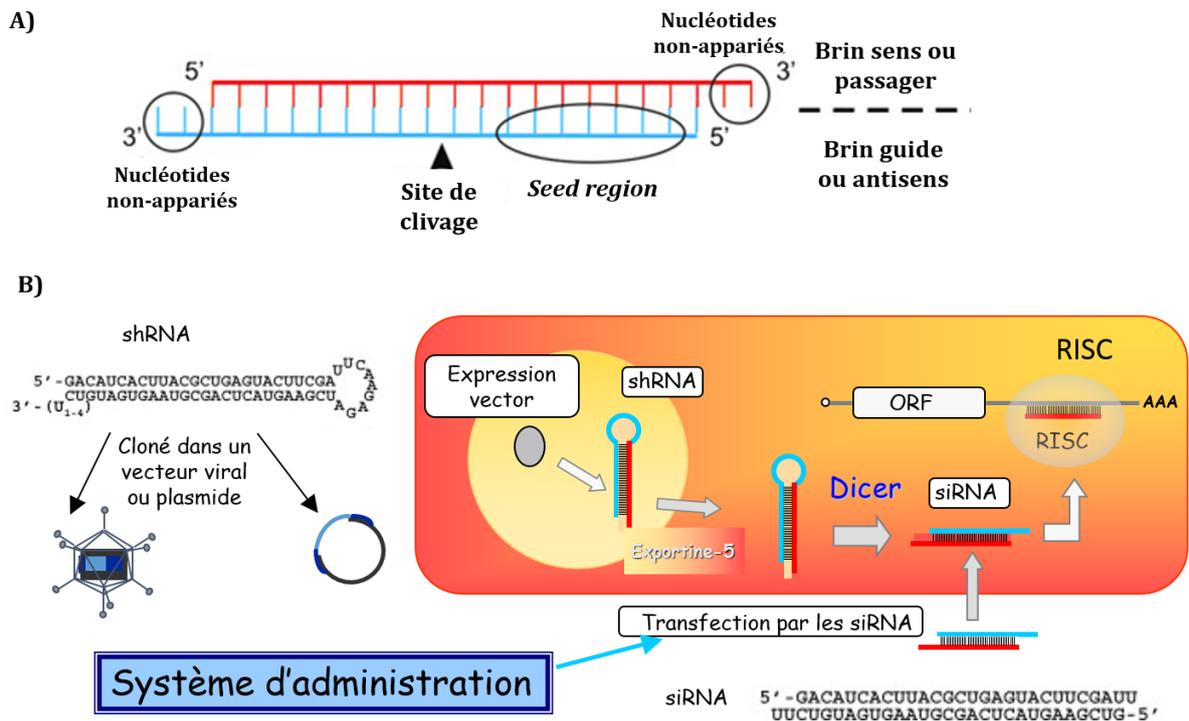


Figure 29 : Structure d'un siRNA et modèle simplifié du mécanisme d'ARNi.

A) Les deux brins du siRNA forment un duplex de 19 nucléotides. Les deux nucléotides des extrémités 3' ne sont pas appariés. La position à laquelle l'ARNm cible complémentaire est clivé est indiquée par une flèche. *Seed Region* est la région par laquelle commence l'interaction avec l'ARNm cible. B) Après internalisation des siRNA dans les cellules *via* des systèmes d'administration, ils sont pris en charge par le complexe RISC. Le brin antisens guide RISC vers l'ARNm cible complémentaire, qui est clivé par la protéine Ago2. Un shRNA peut être introduit dans la cellule en utilisant un plasmide ou un vecteur viral. Le shRNA est exprimé en intracellulaire, exporté dans le cytosol par l'Exportine-5, coupé par Dicer puis rejoint le mécanisme des siRNA.

2.2 Les microARN ou miRNA

Les miRNA sont des duplex d'ARN endogènes d'environ 21 nucléotides impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes. Les miRNA sont impliqués dans plusieurs phénomènes physiologiques tels que le développement, le métabolisme, la différenciation cellulaire, mais également pathologiques comme le cancer ou la fibrose. Le principal mécanisme d'action des miRNA est la répression traductionnelle, bien qu'elle puisse s'accompagner d'une dégradation de l'ARNm. La première étape dans la production des

miRNA est la transcription par l'ARN polymérase II des gènes codant les miRNA, dans le noyau, pour former de longs précurseurs de miRNA ou pri-miRNA. Ces derniers ont une structure particulière en épingle à cheveux, ou tige-boucle, avec des extrémités simple brin en 5' et 3' comme le montre la Figure 30. La deuxième étape implique un système appelé « microprocesseur » constitué de DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) et d'une enzyme RNase de type III « Drosha ». Cette enzyme est responsable du clivage du pri-miR pour former des fragments plus courts de pré-miRNA d'environ 70 nucléotides (Figure 30). Les pré-miR sont ensuite exportés dans le cytoplasme par l'Exportin-5, et pris en charge par Dicer, qui les clivera en duplex d'ARN d'environ 22 nucléotides (Figure 30). Les miRNA forment ensuite un complexe avec RISC, comme les siRNA. Cependant, contrairement à ces derniers, les miRNA se lient préférentiellement aux régions non traduites 3' UTR (*UnTranslated Region*) des séquences cibles, *via* de courtes séquences d'homologie. La liaison a souvent lieu avec une complémentarité incomplète. Selon le degré d'homologie, le résultat peut être un clivage irréversible de la molécule cible ou simplement une répression de la traduction (Kim and Rossi, 2008; Kurreck, 2009).

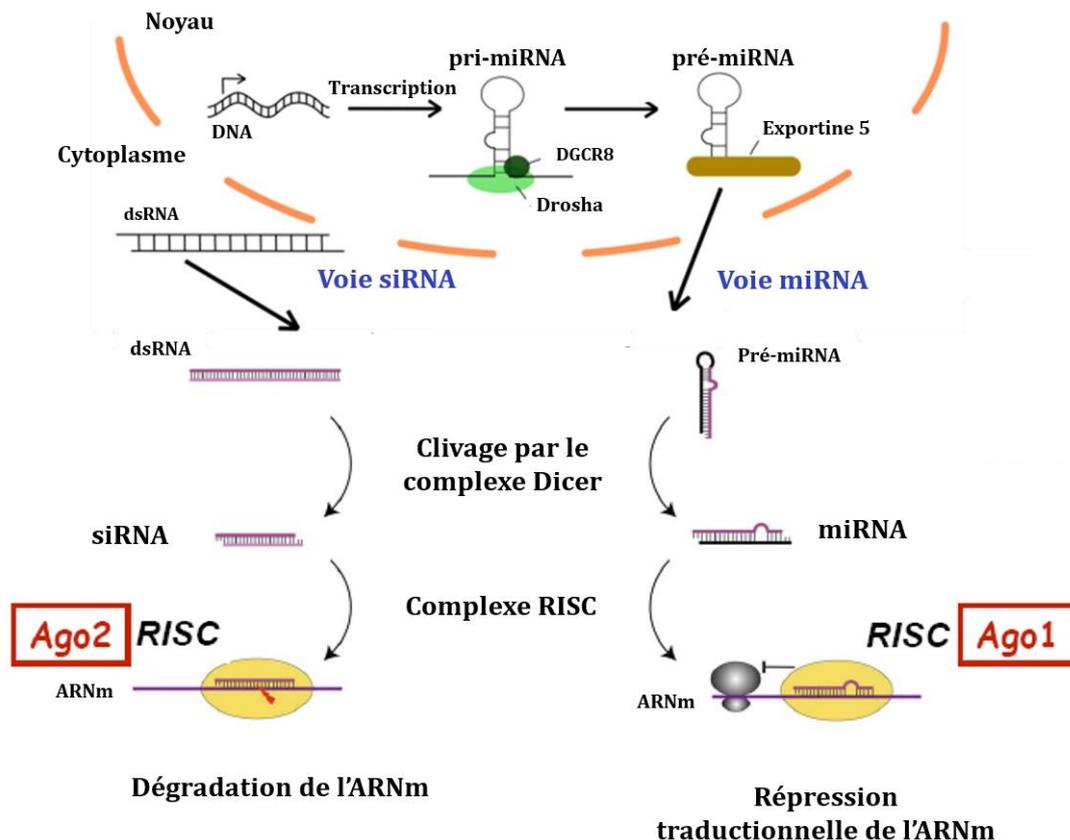


Figure 30 : Représentation schématique des mécanismes d'ARN interférence. Image adaptée de (Oliveira et al., 2019).

3. Applications de l'ARN interférence

En peu de temps, l'ARN interférence est devenue un outil expérimental clé pour l'analyse de la fonction des gènes et la validation des cibles dans les systèmes mammifères, *in vitro* et *in vivo*. De plus, il existe à l'heure actuelle un grand intérêt des chercheurs à utiliser l'ARNi dans un but thérapeutique (Leung and Whittaker, 2005).

3.1 Compréhension de la fonction génique

Il existe environ 35 000 gènes humains codant des milliers de protéines (Novina and Sharp, 2004). Cependant, la compréhension du rôle et de l'implication de certains gènes dans les processus physiologiques et/ou pathologiques reste à élucider. Jusqu'à la découverte de l'ARN interférence, l'étude de la fonction génique, au niveau cellulaire, pouvait être réalisée en exprimant les gènes étudiés dans des conditions données, ou en analysant l'effet de l'extinction de leur expression. Cette dernière stratégie reposait sur la technique du « Knock Out » (KO) de gène, qui consistait à éteindre l'expression d'un gène donné par recombinaison homologue, ou encore sur la technique de mutations dirigées spécifiquement sur un gène.

Ces méthodes classiques pouvaient être coûteuses et parfois très longues à mettre en oeuvre (Figure 31). L'utilisation de l'ARNi représente maintenant un outil puissant pour l'analyse fonctionnelle des gènes, grâce à la possibilité d'inhiber, de manière spécifique, n'importe quel gène du génome, dans un grand nombre de tissus (Leung and Whittaker, 2005). Cette stratégie, qui nécessite de connaître la séquence en nucléotides de l'ARNm cible, présente plusieurs avantages. Premièrement, elle est relativement rapide et simple à mettre en place (Figure 31). De plus, elle offre la possibilité d'inhiber plusieurs gènes, ou une famille de gène possédant un domaine conservé, à l'aide d'une seule transfection. Il est également possible d'obtenir une extinction spécifique d'un tissu, et variable dans le temps grâce aux shRNA possédant des promoteurs inductibles. L'ARNi peut également surmonter les difficultés de création de souris à double knock-out de deux gènes qui sont à proximité immédiate sur le même chromosome (Dorsett and Tuschl, 2004). Des études génomiques par criblage à haut débit de la fonction génique peuvent également être réalisées. Des banques de siRNA ou de vecteurs exprimant des shRNA ont été générées, pour cibler des milliers de gènes humains, afin de déterminer leurs fonctions. Cela a permis d'identifier des gènes impliqués dans des phénomènes pathologiques comme l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ et l'EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) identifiés par l'ARN interférence comme étant impliqués dans l'invasion cellulaire et les métastases (Lipscomb et al., 2003; Osta et al., 2004).

L'étude de la fonction génique par l'ARN interférence est très simple chez *C. elegans*, et ne nécessite pas de vectorisation de l'ARN interférent. En effet, *C. elegans* est nourri par des bactéries, exprimant un ARNdb, permettant l'inhibition de l'expression du gène cible. L'utilisation de la technique d'ARNi dans ces vers a permis d'étudier environ 19 000 gènes impliqués dans des phénomènes complexes tels que l'obésité et le vieillissement, avec des banques de 12 000 ARNdb différents. Cela a conduit à l'identification du rôle de certains gènes spécifiques dans le métabolisme du cholestérol, la formation du cœur chez la mouche du fruit, et d'autres processus cellulaires basiques (Kuttenkeuler and Boutros, 2004; Novina and Sharp, 2004).

Cependant, l'utilisation de la technique d'ARNi pour l'étude de la fonction génique peut être limitée. Tout d'abord, l'extinction des gènes n'est pas totale. De plus, L'expression continue de shRNA pourrait entraîner une toxicité à long terme chez la souris qui se manifeste par des lésions hépatiques dose-dépendante (Grimm et al., 2006). Enfin, l'expression de niveaux élevés de shRNA pourrait induire une compétition entre les siRNA exprimés et les miRNA endogènes, en raison de la saturation de l'Exportin-5, conduisant à une interférence avec l'exportation nucléaire des précurseurs de miRNA et donc, la fonction de ces derniers (Yi et al., 2003).

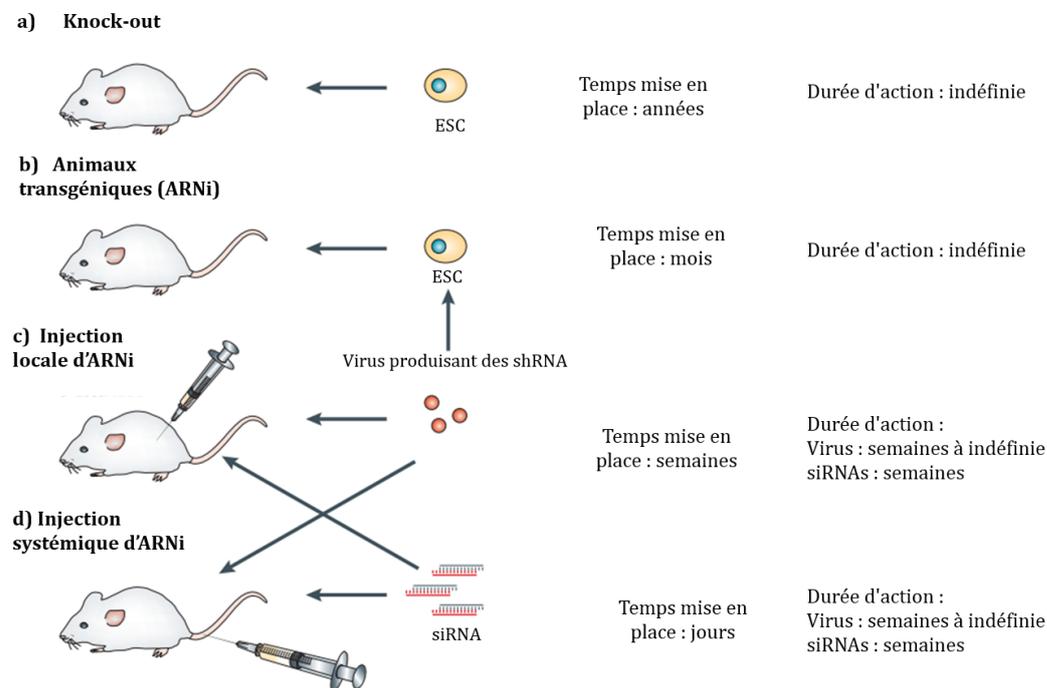


Figure 31 : Inhibition génique *in vivo* chez les mammifères.

La figure décrit plusieurs méthodes d'extinction de l'expression génique chez la souris et compare leur temps de préparation et leur durée d'action. (Abréviations : ESC, cellules souches embryonnaires). Image adaptée de (Dorsett and Tuschl, 2004).

3.2 Identification et validation de cibles thérapeutiques

Un défi clé et une première étape essentielle dans le développement de médicaments est l'identification de nouvelles cibles qui, une fois inhibées, ralentiront ou inverseront la progression de la maladie. Une des stratégies, pour l'identification des cibles, est de développer des souris KO, mais cette technique nécessite un coût élevé et un temps long (voir paragraphe précédent). Les siRNA ont une utilité considérable pour identifier de nouvelles cibles, par exemple pour l'identification des oncogènes, qui stimulent la croissance et la survie des cellules tumorales, car leur inhibition spécifique, par des siRNA, entraînera potentiellement la mort sélective des cellules possédant ces mutations, sans affecter les cellules saines (Iorns et al., 2007; Rondinone, 2006) (Figure 32).

Plusieurs études ont démontré l'intérêt des ARN interférents pour l'identification et la validation de cibles médicamenteuses, notamment Zuber et al. qui ont réussi, par criblage de siRNA, à identifier, *in vivo* et *in vitro*, la protéine Brd4 comme cible thérapeutique pour la leucémie myéloïde aiguë (Zuber et al., 2011). Une fois les cibles potentielles identifiées, l'ARNi peut également être utilisée pour la validation des cibles dans des systèmes cellulaires ou dans des modèles animaux, en particulier grâce au développement de vecteurs d'expression stables et inductibles entraînant l'expression de shRNA (Iorns et al., 2007; Rondinone, 2006).

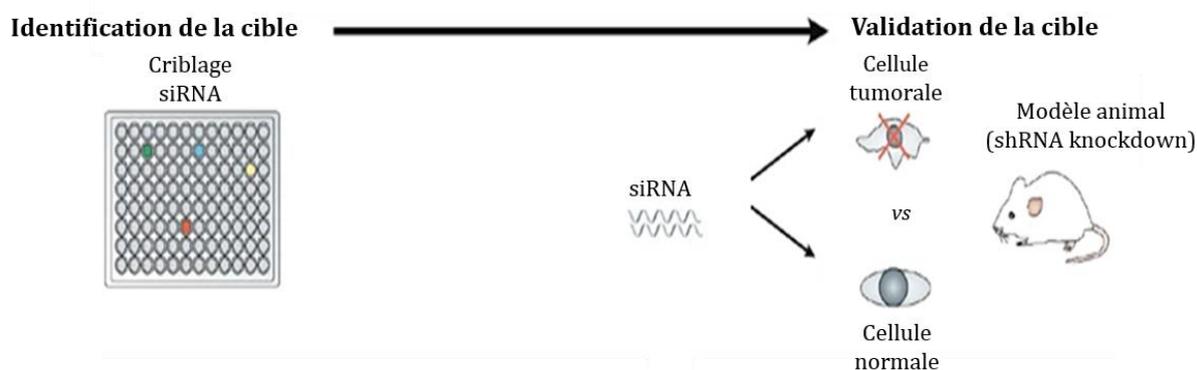


Figure 32 : Utilisation de l'ARNi pour l'identification et la validation de cibles thérapeutiques.

L'ARNi peut être utilisée pour identifier de nouvelles cibles à l'aide de criblage à haut débit. Ces cibles peuvent être validées dans des modèles cellulaires et animaux à l'aide d'ARNi. Image adaptée de (Iorns et al., 2007).

3.3 Applications thérapeutiques

À l'heure actuelle, la majorité des recherches sur l'utilisation thérapeutique de l'ARNi s'est concentrée sur les siRNA, qui présentent un grand potentiel dans le traitement de nombreuses maladies comparé aux shRNA, en particulier en raison des problèmes de sécurité (Khaja et al., 2016). Le but de cette partie est de proposer une liste, non exhaustive, des applications thérapeutiques possibles, avec une description de quelques exemples des études réalisées

pour illustrer l'intérêt thérapeutique des siRNA principalement dans le cancer, les maladies oculaires, virales, métaboliques et héréditaires.

3.3.1 Cancer

La résistance aux médicaments anticancéreux constitue un obstacle majeur au traitement efficace du cancer. Dans la leucémie myéloïde chronique, cette résistance est généralement due à des mutations dans le domaine kinase de la protéine de fusion BCR – ABL qui altèrent la liaison à l'imatinib, le principal traitement de ce type de cancer. L'utilisation de siRNA ciblant la séquence de jonction de cette protéine, atténue la prolifération des cellules hématopoïétiques transformées, et sensibilise les cellules à l'imatinib (Chen et al., 2004). Les siRNA offrent également la possibilité d'inhiber des variants oncogènes spécifiques tout en épargnant les produits de type sauvage de ces gènes. Ainsi, l'utilisation de siRNA a entraîné une extinction ciblée de l'expression du suppresseur de tumeur p53 présentant une mutation ponctuelle mais pas du produit de type sauvage (Martinez et al., 2002).

3.3.2 Maladies virales

Les maladies virales comme la grippe, le sida, l'hépatite et, comme nous l'avons connu plus récemment la COVID-19, provoquent de graves épidémies dans le monde. L'ARN interférence est une défense antivirale naturelle chez les plantes, les champignons et les invertébrés, et offre une stratégie potentielle pour lutter contre l'infection virale chez les mammifères. En effet, les siRNA sont spécifiques et peuvent être dirigés contre plusieurs souches d'un virus en ciblant leurs régions géniques conservées. Ils peuvent être utilisés contre tous les types de génomes viraux. De plus, plusieurs siRNA peuvent être utilisés simultanément pour maintenir un effet antiviral important. Le potentiel antiviral des siRNA a d'abord été démontré contre le virus respiratoire syncytial (Levanova and Poranen, 2018; Qureshi et al., 2018).

Au moins huit formulations de siRNA contre le VHB ont fait l'objet d'essais cliniques, dont certaines développées par Arrowhead Pharmaceuticals, notamment l'ARC-520. Ce candidat-médicament est composé de deux siRNA synthétiques ciblant la région commune à l'extrémité 3' de tous les transcrits du VHB, à partir de son ADN épisomique. L'ARC-520 a été bien toléré chez les sujets sains, et a présenté une bonne activité antivirale (Schlupe et al., 2017; Wooddell et al., 2017). D'autres composés à base de siRNA ont également été développés par le laboratoire Alnylam Pharmaceuticals contre le VHB. Les médicaments à base de siRNA semblent être une option prometteuse pour traiter les infections virales sévères contre lesquelles aucun vaccin efficace ou traitement spécifique n'est encore disponible (Levanova and Poranen, 2018).

3.3.3 Maladies oculaires

La preuve de concept de l'efficacité du siRNA dans l'œil a été établie pour la première fois dans des modèles animaux de néovascularisation oculaire en utilisant à la fois des formulations salines et lipidiques (de Fougerolles et al., 2007). Une réduction de la néovascularisation choroïdienne induite par laser dans un modèle de souris a été observée en utilisant un siRNA ciblant le V-EGF encapsulé dans une formulation lipidique (Reich et al., 2003).

3.3.4 Maladies métaboliques

L'hypercholestérolémie familiale (HF) est caractérisée par une concentration élevée de cholestérol sérique en lipoprotéines de basse densité (LDL). Une mutation dans le gène responsable de l'expression de la protéine PCSK9 (convertase subtilisine / kexine de type 9) a été mise en évidence chez les patients. Etant donné que cette protéine dégrade le récepteur LDL, son inhibition serait une stratégie efficace pour la thérapie de l'HF (Ogura, 2018). Pour cela, l'inclisiran, un siRNA ciblant l'ARNm de la protéine PCSK9, a été développé par Alnylam Pharmaceuticals et testé en clinique sur des patients atteints d'HF (NCT02597127). Ce candidat-médicament est capable de réduire considérablement les taux de cholestérol LDL chez les patients à haut risque cardiovasculaire (Ray et al., 2017).

3.3.5 Maladies héréditaires

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT), la maladie neurologique héréditaire la plus courante, est caractérisée par une démyélinisation des nerfs périphériques, en raison des mutations dans les gènes des cellules de Schwann, en particulier le gène de la protéine 22 de la myéline (PMP22), responsable de la formation et du maintien de la myéline compacte. Un polymère lipidique commercial encapsulant un siRNA dirigé contre un allèle mutant du gène PMP22, a permis de restaurer la myélinisation des nerfs périphériques par les cellules de Schwann et d'améliorer l'activité motrice des souris traitées (Lee et al., 2017).

4. Intérêts et limites à l'utilisation thérapeutique des siRNA

4.1 Les avantages des siRNA

Tout d'abord, les siRNA synthétiques exploitent la voie naturelle de la régulation des gènes, d'une manière cohérente et prévisible, ce qui les rend particulièrement intéressants, comparés aux autres techniques d'inhibition de l'expression protéique. Ils sont également moins susceptibles d'interférer avec la régulation des gènes par des miRNA endogènes puisqu'ils entrent dans la voie de l'ARNi plus tardivement (de Fougerolles, 2008). De plus, un siRNA synthétique ne peut être incorporé dans l'ADN. Le génome n'est donc pas confronté au problème de modification permanente. Cela permet d'arrêter et de contrôler la thérapie à base de siRNA à tout moment et à n'importe quel stade du traitement, ce qui répond à un critère important pour la sécurité du médicament (Tatiparti et al., 2017).

Comparé aux médicaments à base de petites molécules ou d'anticorps, le principal avantage des siRNA est le large choix de cibles thérapeutiques potentielles. En théorie, il est possible d'identifier un siRNA capable d'agir sur n'importe quelle cible par l'appariement de bases avec l'ARNm de la protéine d'intérêt. Les siRNA présentent une spécificité élevée avec la séquence de l'ARNm cible et peuvent donc réguler l'expression d'une protéine donnée sans avoir une action sur d'autres cibles, contrairement aux inhibiteurs de petites molécules ou aux anticorps monoclonaux. En effet, une différence d'un seul nucléotide peut empêcher l'appariement du siRNA avec l'ARNm d'intérêt et abolir l'effet inhibiteur. De plus, la prise en charge rapide des siRNA par le complexe RISC permet de réduire les interactions non spécifiques (Chen et al., 2018).

Les siRNA présentent une efficacité d'inhibition très importante. En effet, une seule molécule de siRNA peut inhiber plusieurs copies d'ARNm cibles. Même à faible dose, les siRNA sont capables d'induire une inhibition importante de l'expression protéique entraînant un effet thérapeutique. Par exemple, le siRNA ciblant la transthyréline (TTR), administré en sous-cutané dans un modèle de souris, a démontré une inhibition génique efficace avec une dose de 1 mg / kg (Wooddell et al., 2017). De plus, les siRNA induisent un effet d'inhibition rapide et transitoire qui dure 3 à 7 jours, dans les cellules à division rapide et, pendant plusieurs semaines, dans les cellules à division lente (Caillaud et al., 2020).

Les siRNA synthétiques peuvent être fabriqués par des procédés qui se prêtent à une production à grande échelle avec une facilité de synthèse, un développement rapide et de

faibles coûts de production par rapport aux thérapies à base de protéines ou d'anticorps (de Fougerolles, 2008; Leung and Whittaker, 2005).

Malgré leurs nombreux avantages, il existe plusieurs obstacles à l'administration des siRNA en raison de problèmes liés à la fois aux propriétés intrinsèques des siRNA, mais aussi aux différentes barrières extracellulaires et intracellulaires de l'organisme, ne permettant pas toujours une administration efficace et sûre (Caillaud et al., 2020).

4.2 Obstacles liés à l'utilisation des siRNA

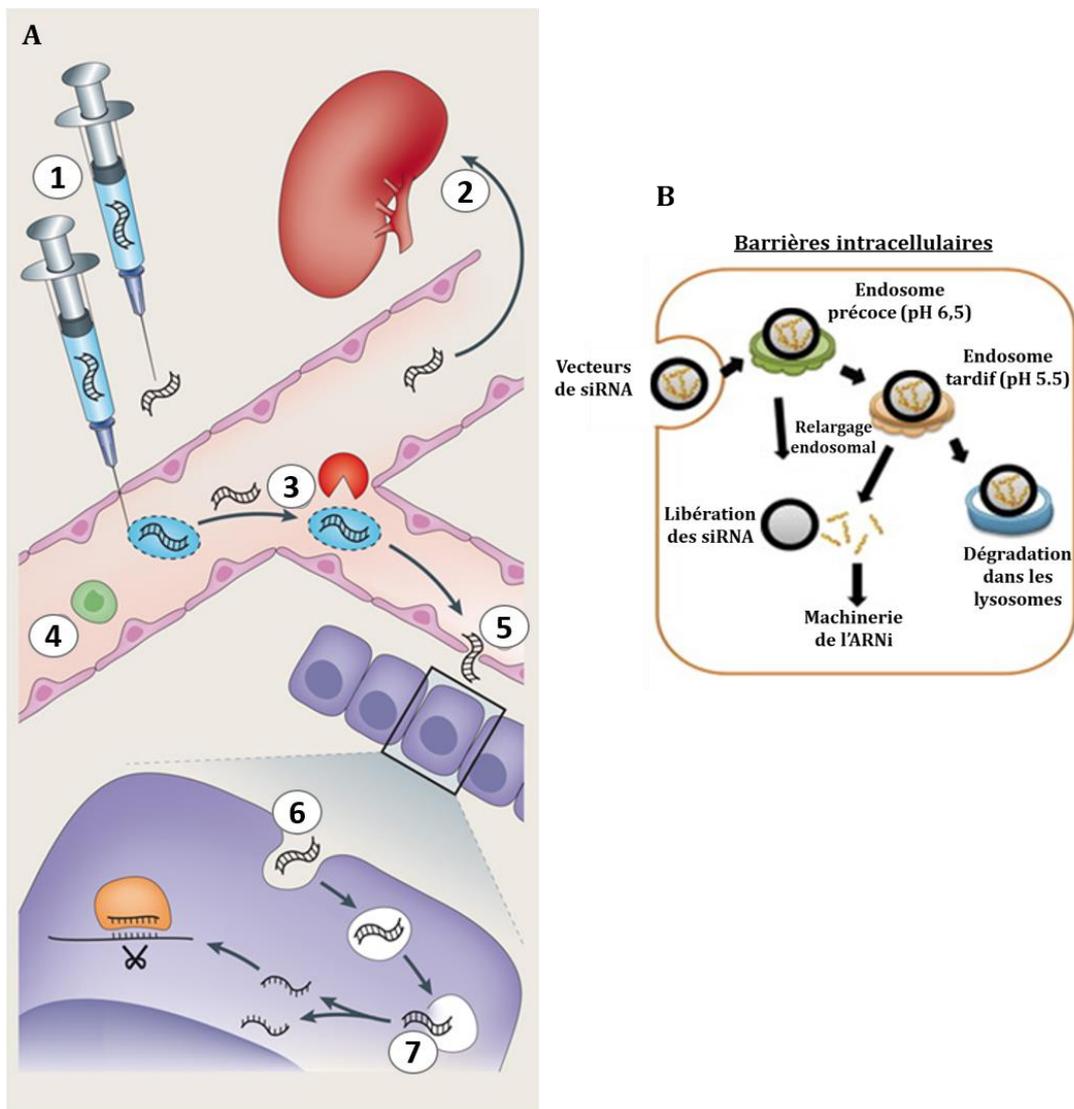


Figure 33 : Obstacles liés à l'utilisation thérapeutique de siRNA.

A) Les siRNA thérapeutiques font face à de multiples barrières, de l'administration à la distribution au site cible intracellulaire. Les barrières majeures sont 1) administration systémique, 2) élimination rénale, 3) dégradation par les nucléases, 4) reconnaissance par le système réticuloendothélial, 5) extravasation, 6) absorption cellulaire, 7) relargage endosomal. B) Une fois internalisés, les siRNA peuvent ne pas atteindre leur ARNm cible en raison de leur incapacité à s'échapper de l'endosome et seront alors dégradés dans les lysosomes. Image adaptée de (Wittrup and Lieberman, 2015; Xu and Wang, 2015).

4.2.1 Stabilité dans le sang

Le premier obstacle est la sensibilité des siRNA aux nucléases endogènes, les rendant instables dans les fluides biologiques. De plus, en raison de leur taille inférieure à 10 nm, et leur poids moléculaire inférieur à 40 kDa, les siRNA sont sujets au processus de filtration rénale, entraînant leur élimination rapide dans les urines (Figure 33). Les siRNA sont également absorbés par les cellules phagocytaires du système réticuloendothélial, diminuant leur temps de circulation (Figure 33). La demi-vie d'un siRNA non modifié dans le sérum est d'environ 20 minutes (Chandela and Ueno, 2019; Leung and Whittaker, 2005).

4.2.2 Stimulation immunitaire

Bien que les ARN soient de faibles immunogènes, les siRNA sont capables, en revanche de stimuler le système immunitaire inné, après reconnaissance en tant que fragment étranger par les macrophages et les cellules de Kupffer, grâce aux TLR (*Toll-like Receptors*) (de Fougerolles, 2008; Wittrup and Lieberman, 2015). En effet, il a été décrit que les duplexes de siRNA contenant des motifs immunostimulants, comme les motifs CpG ou certaines séquences riches en GU (par exemple UGUGU), peuvent entraîner la production de cytokines et d'interférons (IFN- α , IL-6 et TNF- α) *via* une interaction avec les TLR. Cela peut induire des effets secondaires ou une destruction des siRNA avant d'atteindre la cible, diminuant ainsi leur efficacité (Akhtar and Benter, 2007; Tatiparti et al., 2017).

4.2.3 Barrière vasculaire

Traverser la barrière vasculaire est une étape cruciale pour l'administration des siRNA aux organes cibles, lors d'une administration systémique. Cette étape est appelée extravasation (Figure 33). Par conséquent, la connaissance et l'exploitation des caractéristiques vasculaires du tissu cible sont fondamentales pour une administration réussie de siRNA. En effet, le système vasculaire possédant un endothélium discontinu, avec des fenestrations, permet le passage de molécules d'une taille <100 nm. Ces capillaires se trouvent essentiellement dans le foie, la rate et dans certaines tumeurs solides. Cependant, il sera plus difficile de cibler les organes présentant des jonctions serrées au niveau de l'endothélium de la lame basale qui les entoure, limitant ainsi la sortie passive des siRNA de la circulation sanguine. Par exemple, dans le système nerveux, la barrière hémato-encéphalique et la barrière hémato-nerveuse constituent un obstacle au passage des médicaments à base de siRNA (Tatiparti et al., 2017).

4.2.4 Barrière cellulaire

Pour parvenir à une régulation génique, les siRNA doivent atteindre le cytoplasme des cellules cibles. L'internalisation cellulaire des siRNA représente donc une étape limitante

supplémentaire. La membrane cellulaire est constituée de phospholipides chargés négativement, organisés en bicouche constituée également de protéines fonctionnelles. L'internalisation cellulaire des siRNA est ainsi limitée, en raison de la répulsion provoquée par sa nature anionique, son haut poids moléculaire et son hydrophilie empêchant son absorption cellulaire (Chen et al., 2018; Tatiparti et al., 2017).

L'internalisation cellulaire des siRNA est généralement permise par leur formulation dans un vecteur d'administration et suivra les voies classiques d'internalisation cellulaire, comme par exemple l'endocytose. Cependant, les siRNA doivent atteindre le cytoplasme de la cellule, où se situe la machinerie de l'ARN interférence. La formulation des systèmes d'administration de siRNA détermine le mécanisme d'internalisation cellulaire et la façon dont le siRNA s'échappe de l'endosome (Figure 33). Ces mécanismes d'endocytose varient selon la charge de surface et la taille des particules contenant les siRNA, leur structure chimique et leur fonctionnalisation de surface. Les différents mécanismes d'endocytose par lesquels les siRNA peuvent entrer dans les cellules sont : i) La macropinocytose, qui est un mécanisme d'internalisation non spécifique, similaire à la phagocytose, mais se produisant dans toutes les cellules. Ce mécanisme est caractérisé par une taille de vésicules de 100 nm à 5 µm ; ii) L'endocytose médiée par la clathrine et les cavéoles, qui est également une endocytose médiée par les récepteurs. Elle est définie par une taille de vésicules d'internalisation de 120 et 80 nm respectivement (Caillaud et al., 2020). La fonctionnalisation de la surface des nanoparticules par un ligand spécifique induit une endocytose médiée par les récepteurs exprimés par les cellules cibles (Xu and Wang, 2015). Une fois lié à son récepteur, le ligand déclenche une absorption cellulaire, dans des vésicules endocytaires liées à la membrane, qui fusionnent avec les endosomes précoces.

4.2.5 Relargage de l'endosome

Une fois à l'intérieur des cellules, les siRNA se situent dans les endosomes précoces. La maturation en endosomes tardifs est corrélée à une diminution du pH, à l'activation des enzymes impliquées dans la dégradation des siRNA et enfin à la fusion avec les lysosomes (Figure 33). Dans ces derniers, les siRNA sont dégradés par diverses nucléases avant qu'ils n'atteignent l'ARNm cible, limitant ainsi la biodisponibilité des siRNA. Pour atteindre le complexe RISC dans le cytoplasme, les siRNA doivent s'échapper de l'endosome. Idéalement, la libération endosomale devrait se produire avant que les endosomes tardifs ne fusionnent avec les lysosomes. Le mécanisme exact de libération endosomale de nombreux systèmes d'administration de siRNA est toujours mal compris (Tatiparti et al., 2017; Xu and Wang, 2015).

4.2.6 Effets hors cible

Toutes les thérapies à base d'oligonucléotides présentent des effets hors cible qui peuvent provoquer une toxicité. En effet, les gènes peuvent partager des similitudes partielles sur leur séquence. Par conséquent, si la séquence choisie de siRNA n'est pas assez spécifique, le siRNA peut interagir avec d'autres ARNm et induire une inhibition non spécifique des gènes. De plus, une complémentarité partielle des séquences d'ARNm endogènes avec des siRNA, en particulier dans la région 3'UTR peut conduire à leur suppression *via* un mécanisme de microARN, ce qui entraînerait une toxicité, ou des changements inattendus dans le comportement cellulaire. Ces effets hors cible dépendent de la séquence et de la concentration des siRNA (Akhtar and Benter, 2007; Refaat et al., 2016; Wittrup and Lieberman, 2015).

4.3 Les stratégies pour surmonter les obstacles

Les obstacles décrits ci-dessus pourraient être surmontés grâce à la conception appropriée des siRNA ainsi que le développement de vecteurs ou systèmes d'administration. Cela assure l'administration des siRNA sous une forme intacte aux cellules cibles, sans induire un effet secondaire toxique ou immunologique. Les principales approches pour surmonter les obstacles liés à l'administration de siRNA sont résumées dans le Tableau 5, et seront décrites plus en détail dans la partie (Vectorisation). Quelques stratégies sont également schématisées dans la Figure 34.

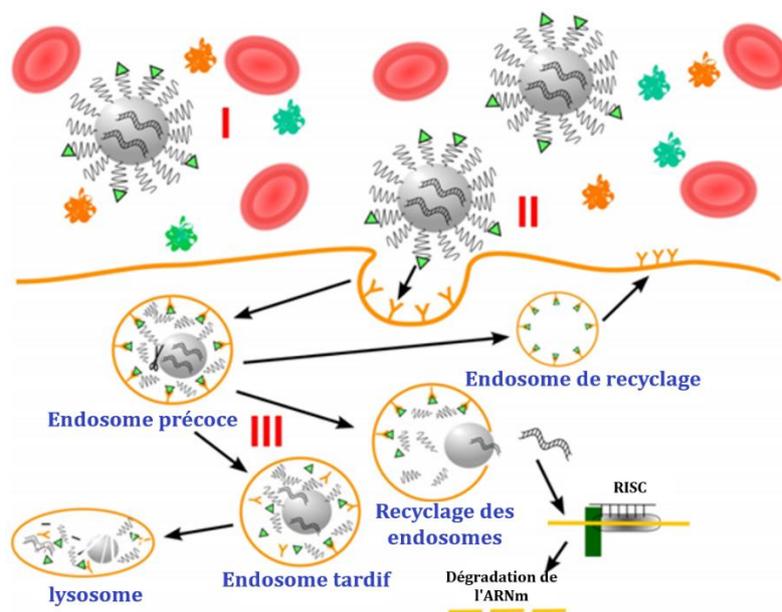


Figure 34 : Représentation schématique de quelques stratégies communes pour surmonter les obstacles liés à l'administration systémique et non virale de siRNA.

I) PEGylation des nanosupports pour éviter l'agrégation et les interactions non spécifiques avec les composants sériques (cellules et protéines), II) Utilisation de ligands de ciblage pour améliorer l'absorption cellulaire des vecteurs par endocytose médiée par les récepteurs, III) Utilisation de matériaux « intelligents » pour permettre la dissociation des chaînes PEG de la surface des nanosupports et favoriser le relargage endosomal. Image adaptée (Oliveira et al., 2019).

Approche	Description
1. Atteindre la circulation ou le tissu cible	
Administration parentérale	Pour les NPL et autres nanoparticules
Injection sous-cutanée	Atteindre le tissu cible <i>via</i> les vaisseaux lymphatiques (conjugués de siRNA)
Application topique	Pour cibler la peau, les yeux et les muqueuses
2. Éviter l'excrétion et augmenter le temps de circulation	
PEGylation	Éviter l'excrétion rénale et l'élimination par le système RE
Conjugaison au cholestérol	Liaison aux apolipoprotéines endogènes et augmentation de leur temps de circulation
Formulation de nanoparticules	Taille > seuil de filtration rénale (environ 100 nm)
3. Éviter la dégradation par les nucléases	
Modifications du squelette	Ajout de nucléotide de type ADN, liaisons phosphorothioates et autres modifications des ribonucléotides
Formulation de nanoparticules	Encapsulation du siRNA dans des vecteurs d'administration
4. Éviter la reconnaissance immunitaire	
Modifications du squelette	Modifications 2'-O-méthyl et 2'-fluoro
PEGylation	Minimiser la liaison aux cellules phagocytaires et aux autres cellules du SI
5. Extravasation	
Cibler les tissus ayant un endothélium discontinu	Foie, rate et certaines tumeurs solides
Transcytose endothéliale	Accéder à n'importe quel tissu en liant des récepteurs endothéliaux spécifiques à induire une transcytose
Cibler les cellules endothéliales ou sanguines	Pas besoin de traverser le système vasculaire
6. Absorption cellulaire	
Ligand de ciblage	Conjugaison du siRNA ou du vecteur d'administration à un ligand du récepteur (peptide, aptamère, fragment d'anticorps...)
Association avec un ligand endogène	Ex : cholestérol, liaison aux lipoprotéines sériques et absorption spécifique par les hépatocytes
7. Libération endosomale	
Lipides déstabilisants de la membrane	Nanoparticules lipidiques contenant des lipides perturbateurs des bicouches lipidiques activés par un faible pH endosomal
Peptides et polymères déstabilisants de la membrane	Démasquage des peptides ou polymères endosomolytiques dans les endosomes (deviennent chargés positivement) et déstabilisation de la membrane
Augmenter l'accumulation endosomale	Compenser la faible libération par une quantité suffisante de siRNA (seulement quelques centaines de siRNA sont nécessaires pour une suppression maximale)

Tableau 5 : Les stratégies thérapeutiques pour surmonter les obstacles liés à l'utilisation des siRNA.

Abréviations : IV, intraveineuse ; NPL, nanoparticule lipidique ; PEG, polyéthylène glycol ; RE, réticulo-endothélial, SI : système immunitaire. Adapté de (Saw and Song, 2020; Wittrup and Lieberman, 2015).

4.4 Voies d'administration

La voie d'administration peut avoir un impact profond sur la biodisponibilité et la biodistribution des médicaments à base de siRNA (Setten et al., 2019). Les voies qui seront décrites ci-dessous concernent principalement les siRNA vectorisés.

4.4.1 Voie systémique

Le mode d'administration le plus courant de la thérapie à base de siRNA est l'administration systémique par injection intraveineuse ou par perfusion. Cette voie a été largement utilisée pour l'administration des nanoparticules de siRNA. Elle permet une distribution dans toute la circulation sanguine et un accès rapide aux tissus cibles, en évitant une élimination hépatique rapide, par effet de premier passage. Cependant, en raison de la petite taille des oligonucléotides, les siRNA peuvent sortir de l'organisme dans les 30 minutes *via* l'élimination rénale, et les formulations de nanoparticules peuvent être éliminées en quelques heures ou jours par le système réticulo-endothélial. Le vecteur doit donc protéger les siRNA de la dégradation par les nucléases et éviter leur élimination *via* le système réticulo-endothélial ou la filtration rénale, mais aussi de l'absorption par les tissus non ciblés, en utilisant par exemple des ligands de ciblage. Pour les patients et les médecins, l'administration IV peut être lourde et nécessite souvent de longues visites à l'hôpital, en particulier en raison des effets secondaires rares mais graves tels que l'embolie pulmonaire, qui peut être provoquée par l'injection intraveineuse de (grandes) particules cationiques ou agglomérats de particules. Enfin, la voie systémique peut induire des réactions d'hypersensibilité fréquentes, qui peuvent être évitées par un traitement antihistaminique prophylactique. Malgré ces défis, les avantages de la biodisponibilité et de la biodistribution de l'administration IV sont essentiels au fonctionnement de certaines formulations (Buck et al., 2019; Cavallaro et al., 2017; Chen et al., 2018; Setten et al., 2019).

4.4.2 Voie sous-cutanée

En raison des complications de l'administration IV, l'injection sous-cutanée dans le tissu adipeux sous l'épiderme et le derme a gagné en popularité, en particulier avec l'utilisation croissante de bioconjugués de siRNA. L'injection sous-cutanée est plus rapide et plus facile à administrer, elle peut même être réalisée par les patients eux-mêmes, ce qui réduit la lourdeur du traitement. Les molécules administrées par voie sous-cutanée ont une libération plus lente dans le sang. Cette voie a l'avantage de contourner l'effet de premier passage du foie, et de permettre l'accès des siRNA à la circulation *via* les capillaires ou le drainage lymphatique depuis l'espace interstitiel, ce qui laisse le temps aux récepteurs cellulaires impliqués dans l'absorption des particules d'être recyclés et d'éviter une saturation par les médicaments.

Cependant, la lipophilie et la taille des vecteurs doivent être soigneusement prises en compte pour éviter la phagocytose par les cellules phagocytaires du système immunitaire (Setten et al., 2019; Tatiparti et al., 2017).

4.4.3 Voie loco-régionale

Malgré les avancées réalisées dans la connaissance des ligands et des excipients, les propriétés pharmacocinétiques intrinsèques des médicaments à base de siRNA ne permettent pas l'accès à tous les tissus malades par voie systémique ou sous-cutanée. Par conséquent, la voie locale offre une approche alternative. Elle correspond à l'administration directe du médicament à l'intérieur du tissu, augmentant ainsi sa biodisponibilité, compte tenu de la proximité avec les tissus cibles. Cette voie permet également de limiter les effets secondaires indésirables liés au siRNA ou au vecteur pouvant survenir lors de l'administration systémique. En général, l'administration loco-régionale de siRNA présente moins de barrières que l'administration systémique et la dose administrée du siRNA thérapeutique peut être réduite. Des stratégies d'administration localisées pourraient donc élargir l'utilisation thérapeutique des siRNA dans les tissus où l'efficacité de l'administration systémique de ces médicaments est actuellement insuffisante. Cependant, en raison de l'accessibilité aux sites cibles, seuls quelques tissus sont candidats à une thérapie localisée, comme les yeux, la peau, les poumons et les tumeurs locales. Par exemple, l'administration locale de siRNA dans l'œil a été utilisée pour montrer que les siRNA ciblant la voie du V-EGF pourraient avoir un bénéfice thérapeutique dans les maladies oculaires liées à la néovascularisation. Une administration intracardiaque de siRNA ou encore des injections dans le liquide céphalo-rachidien ont également été testées *in vivo* (Buck et al., 2019; Cavallaro et al., 2017; Setten et al., 2019).

4.4.4 Voie orale

La voie orale représente la voie la plus pratique et la plus fréquemment utilisée pour l'administration des médicaments. Il s'agit d'une voie non invasive, indolore et la plus confortable pour le patient. Elle permet une bonne observance et une réduction des coûts des soins de santé. L'administration des siRNA par voie orale peut être appliquée à la fois pour le traitement des maladies du tube digestif comme les allergies alimentaires, les maladies inflammatoires de l'intestin ou les cancers intestinaux, mais également pour des maladies nécessitant une action sur un site éloigné. En effet, le siRNA peut accéder à la circulation sanguine, grâce à la vascularisation importante et la grande surface d'absorption de l'épithélium intestinal. Cependant, l'administration orale des siRNA, et des acides nucléiques en général, est confrontée à plusieurs obstacles. Tout d'abord, le pH dans le tractus gastro-intestinal, en particulier l'environnement acide de l'estomac (pH 1,5–1,9), entraîne une dénaturation et une dépurination des acides nucléiques, conduisant à une diminution de leur

efficacité. De plus, le péristaltisme du tractus gastro-intestinal réduit le contact des vecteurs de siRNA avec les cellules épithéliales, diminuant ainsi leur absorption. Le mucus intestinal ainsi que le glycocalyx, présent sur la membrane apicale des entérocytes, constituent des barrières physiques à l'absorption des siRNA et de leurs vecteurs. Traverser la barrière intestinale se fait soit par voie paracellulaire à travers des jonctions serrées, ou par voie transcellulaire notamment à travers les entérocytes. Une fois que les siRNA ont atteint le cytoplasme des entérocytes, ils peuvent être dégradés par les nucléases dans les lysosomes de ces cellules avant d'atteindre la circulation sanguine (Busignies et al., 2017).

Pour contourner ces obstacles des vecteurs de siRNA ont été développés afin d'assurer le transport de ces derniers de la lumière intestinale vers la circulation sanguine. Les vecteurs à base de lipides cationiques, ne peuvent pas être utilisés seuls pour l'administration des siRNA par voie orale, en raison de leur instabilité dans l'environnement intestinal. Néanmoins, des complexes siRNA/lipides cationiques peuvent être encapsulés dans des nanoparticules en utilisant un polymère composé de liaisons thiocétal, qui sont stables à la dégradation par les acides, les bases et les protéases et sensibles aux ROS. Ce polymère permettrait la libération des siRNA dans les tissus où les niveaux de ROS sont élevés (Wilson et al., 2010). Contrairement aux lipides, les approches à base de polymères sont plus utilisées pour l'administration orale de siRNA notamment le chitosane, en raison de sa forte affinité pour les acides nucléiques, sa bioadhésion et sa biodégradabilité. Ce polysaccharide muco-adhésif naturel semble augmenter le transport transcellulaire et paracellulaire des macromolécules à travers les monocouches épithéliales intestinales. Les complexes chitosane/acides nucléiques forment des particules de tailles variables (tailles moyennes de 100 à 600 nm), selon le poids moléculaire du chitosane et du rapport chitosane/acide nucléique. Par ailleurs, des modifications du chitosane ont été proposées, telles que la triméthylation afin d'améliorer sa solubilité dans les milieux neutres et alcalins. Ces formulations à base de chitosane modifié se sont révélées efficaces pour favoriser l'absorption intestinale des siRNA et leur transport vers d'autres organes tels que le foie et la rate (Ballarín-González et al., 2013; Zhang et al., 2013). Les différentes formulations développées pour l'administration orale de siRNA ont été testées dans des modèles précliniques mais aucune d'entre elles n'a atteint, à l'heure actuelle, le stade clinique (Busignies et al., 2017).

5. Vectorisation

Pour surmonter les obstacles liés à l'utilisation des siRNA, des systèmes d'administration sont nécessaires pour protéger les siRNA de la dégradation par les nucléases et améliorer leurs paramètres pharmacocinétiques. Ces systèmes sont capables de prolonger le temps de circulation sanguine, d'améliorer leurs propriétés de distribution aux cellules cibles et d'optimiser l'absorption intracellulaire des siRNA afin d'améliorer leur efficacité. En plus d'augmenter l'efficacité des siRNA, ces vecteurs doivent être non toxiques, biocompatibles, biodégradables et non immuno-stimulateurs (Caillaud et al., 2020; Cavallaro et al., 2017; Kurreck, 2009). Les systèmes de vectorisation de siRNA décrits dans la littérature sont très nombreux, c'est pourquoi nous allons nous concentrer principalement sur ceux qui ont été testés en clinique. Ces systèmes d'administration sont généralement divisés en deux classes : les vecteurs viraux de cassettes d'expression de shRNA et les vecteurs non viraux de siRNA synthétisés chimiquement.

5.1 Les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux	Avantages	Inconvénients	Tropisme	Stimulation immunitaire
Vecteurs adéno-associés (AAV)	Effet à long terme ; non pathogène, non inflammatoire	Faible capacité d'encapsulation	Indépendant du statut des cellules	Très faible
Vecteurs de lentivirus (LV)	Effet à long terme dans la plupart des tissus. Stable, efficace	Problème de sécurité, oncogénicité potentielle (néoplasie)	Indépendant du statut des cellules	Faible
Vecteurs de rétrovirus (RV)	Stables, effet à long terme	Problème de sécurité, oncogénicité potentielle (néoplasie)	Cellules en division uniquement	Modérée
Vecteurs d'adénovirus (AV)	Stabilité et importante efficacité dans la plupart des cellules	Capside virale peut induire des réponses inflammatoires et immunitaires, courte durée d'action, toxicité hépatique	Indépendant du statut des cellules	Haute

Tableau 6 : Comparaison des principaux vecteurs viraux utilisés pour l'administration de siRNA.

Adapté de (Gao and Huang, 2013; McCarthy et al., 2010; Pan et al., 2015).

Les vecteurs viraux sont des systèmes d'administration très efficaces, utilisant des virus recombinants issus de la thérapie génique, qui consiste à introduire de l'ADN dans les cellules. Ces vecteurs permettent l'administration de cassettes d'expression à base d'ADN exprimant les shRNA dans les cellules cibles. Les vecteurs viraux offrent des avantages tels que l'inhibition génique soutenue et la facilité d'expression de plusieurs copies de molécules d'ARN interférents, à partir d'un seul transcrit. De plus, ils présentent un excellent tropisme tissulaire. L'efficacité de divers vecteurs viraux a été démontrée dans un large éventail de cellules de mammifères. Les vecteurs viraux peuvent être introduits aux cellules cibles en *ex vivo*, puis réinjecter ces cellules transduites au patient (Chen et al., 2018; Shim and Kwon, 2010). Plusieurs systèmes viraux d'administration de siRNA tels que les vecteurs de lentivirus (LV),

les vecteurs adéno-associés (AAV), les vecteurs d'adénovirus (AV) et les vecteurs de rétrovirus (RV) ont été développés et évalués. Les avantages et les inconvénients des principaux vecteurs viraux sont détaillés dans le Tableau 6.

Compte tenu de leur efficacité de transfection élevée, les vecteurs d'adénovirus et de lentivirus représentent les vecteurs viraux les plus largement utilisés (Calvente et al., 2015). Cependant, des problèmes de sécurité tels que l'insertion du matériel génétique viral dans le génome des patients (la mutagénèse par insertion), l'immunogénicité et la production coûteuse à grande échelle limitent l'utilisation généralisée des vecteurs viraux pour l'administration de siRNA en milieu clinique. Par conséquent, les homologues synthétiques (les vecteurs non viraux) ont été explorés de plus en plus intensivement comme une alternative sûre et efficace, facile à utiliser et à préparer et pouvant fournir de grandes quantités de siRNA (Chen et al., 2018; Gao and Huang, 2013; Shim and Kwon, 2010).

5.2 Les vecteurs non viraux

Les vecteurs non viraux sont généralement supérieurs aux vecteurs viraux en termes de sécurité, notamment en raison de leur plus faible immunogénicité et de l'absence du risque d'infection. Ils présentent également d'autres avantages comme la simplicité d'utilisation ou leur importante capacité d'encapsulation. Cependant, ils présentent une plus faible efficacité de transfection comparé aux vecteurs viraux (Chen et al., 2016; Gao and Huang, 2013). Les principaux avantages et inconvénients des deux classes de vecteurs sont résumés dans le Tableau 7.

	Vecteurs viraux	Vecteurs non viraux
Avantages	Haute efficacité de transduction	Immunogénicité et antigénicité faibles Aucun risque d'insertion chromosomique Facilité de production
	Capacité à infecter de nombreux types cellulaires	Possibilité de fonctionnalisation pour une administration ciblée et/ou un échappement endosomal Faible toxicité
	Évasion endosomale optimisée	Protection du matériel génétique contre les facteurs de dégradation
	Une distribution efficace	Réduction des effets secondaires
Inconvénients	Forte réponse immunitaire	Faible efficacité de transfection
	Possibilité d'insertion chromosomique et d'activation du proto-oncogène	Des doses élevées sont toxiques
	Production difficile	Manque de tropisme intrinsèque
	Possibilité de contamination par un virus vivant Taille plasmidique limitée	Absence de mécanisme intrinsèque d'échappement endosomal

Tableau 7 : Avantages et inconvénients des vecteurs viraux et non viraux pour l'administration de siRNA.
Adapté de (Oliveira et al., 2019).

5.2.1 La modification chimique des siRNA

Les nucléases sont capables de dégrader les acides nucléiques par coupure de la liaison phosphodiester entre deux nucléotides. De plus, la présence du groupe hydroxyle (OH) en 2' du ribose rend les molécules d'ARN moins stables chimiquement comparé à l'ADN. La structure de la molécule d'ARN est représentée dans la Figure 35.

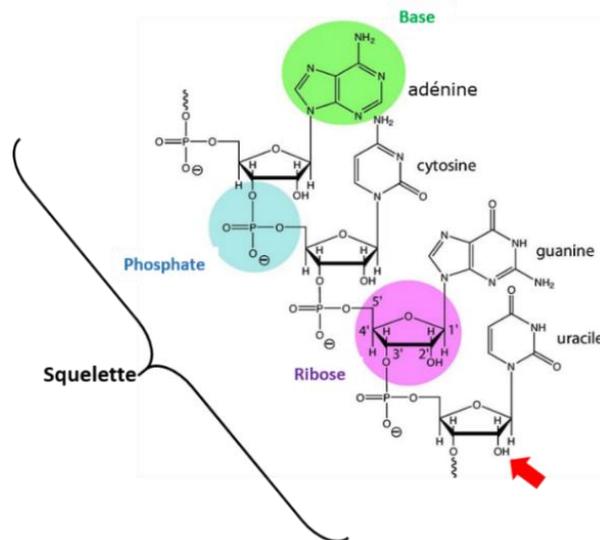


Figure 35 : Structure d'un ARN.

La modification chimique de la base, du sucre ou du squelette du siRNA contribue à sa stabilité en augmentant sa résistance aux nucléases. Cette modification des siRNA implique souvent l'incorporation de nucléotides 2'O-méthyl (2'OMe-guanine, 2'OMe-uracile ou 2'OMe- adénosine), 2'O-fluoro, des acides nucléiques verrouillés ou déverrouillés ou des liaisons phosphorothioates (Figure 36).

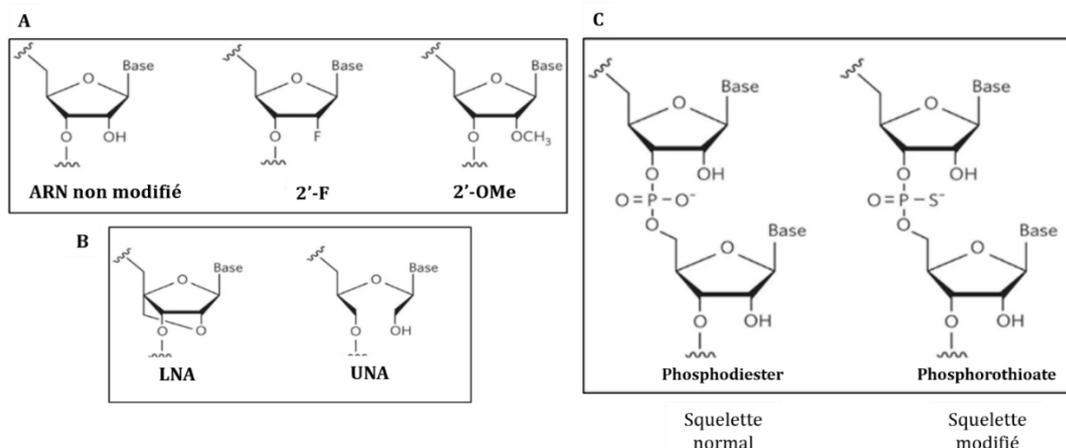


Figure 36 : Modifications chimiques courantes du squelette de siRNA.

Les modifications courantes du cycle ribose comprennent le fluor (2'-F), le méthoxy (2'-OMe) (A), les acides nucléiques verrouillés (LNA) et les acides nucléiques déverrouillés (UNA) (B). Les liaisons phosphodiesters entre les nucléotides sont souvent remplacées par des liaisons phosphorothioates (C). Image adaptée de (Kanasty et al., 2013).

La modification chimique permet également d'éviter l'induction des cytokines (TNF- α , IL-6, IFN- α) et de diminuer la toxicité et les effets hors cible pouvant survenir avec des siRNA non modifiés (Judge et al., 2006; Kanasty et al., 2013). Des exemples de modifications chimiques sont résumés dans le Tableau 8.

Modification	Caractéristiques
Phosphorothioate (PS)	L'un des oxygènes phosphatés ne formant pas de pont est remplacé par un soufre <ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la résistance aux nucléases - Amélioration de la pharmacocinétique
Phosphorodiamidate morpholino oligonucléotides (PMO)	Le ribose est remplacé par un cycle morpholine et les groupes phosphorothioate ou phosphodiester sont remplacés par des groupes phosphorodiamidate <ul style="list-style-type: none"> - Molécule neutre, augmentation de la résistance aux nucléases - Utilisé pour l'arrêt de la traduction ou les modifications d'épissage
2'-O-méthoxyéthyl (2'-MOE) et 2'-O-méthyl (2'-OMe)	Modifications de la position 2' <ul style="list-style-type: none"> - Augmente la résistance aux nucléases
Acides nucléiques verrouillés (LNA)	Système bicyclique avec le carbone en 4' attaché au groupe hydroxyle en 2' <ul style="list-style-type: none"> - Améliore les propriétés d'hybridation et la résistance aux nucléases

Tableau 8 : Exemples de modifications chimiques de siRNA.

Adapté de (Oliveira et al., 2019).

Un autre facteur important pour la sécurité et l'efficacité du siRNA est le choix de la séquence. En effet, toutes les séquences complémentaires d'un ARNm cible ne sont pas forcément efficaces pour l'inhibition de son expression, une combinaison d'algorithmes informatiques et de tests empiriques sont employés pour définir des séquences de siRNA potentiellement spécifiques et puissantes. De plus, certaines séquences de siRNA peuvent présenter une activité immunostimulante notamment les séquences riches en CpG. Minimiser le contenu en CpG des siRNA pourrait donc diminuer la toxicité et les effets secondaires de ces derniers (Akhtar and Benter, 2007).

Bien que les siRNA chimiquement modifiés soient efficaces, spécifiques, stables et non toxiques lors de l'administration intraveineuse, il existe un certain risque potentiel que la modification chimique puisse compromettre l'efficacité du siRNA. De plus, les molécules non naturelles, produites lors de la dégradation d'un siRNA chimiquement modifié, peuvent générer des métabolites qui pourraient induire des effets toxiques. Enfin, malgré la diminution de l'immunogénicité du siRNA par les modifications chimiques et l'augmentation de sa stabilité vis-à-vis des nucléases, des systèmes d'administration sont nécessaires pour surmonter les autres barrières biologiques (Bajan and Hutvagner, 2020; Shim and Kwon, 2010).

5.2.2 La bioconjugaison des siRNA

Pour améliorer la distribution des siRNA, la conjugaison directe de manière covalente des siRNA à des molécules comme les lipides, les aptamères, les glucides ou les peptides, a été l'une des premières approches employées. Afin de ne pas gêner l'attachement au complexe RISC et le maintien du brin guide (la partie active du siRNA), la conjugaison est généralement effectuée sur le brin sens ou l'extrémité 3' du brin antisens, car l'extrémité 5' du brin antisens est nécessaire pour l'activité d'inhibition génique (Dong et al., 2019; Roberts et al., 2016). Cette stratégie permet d'utiliser directement le siRNA conjugué et d'éviter l'éventuelle toxicité pouvant être apportée par les différents composants d'un vecteur.

La bioconjugaison de siRNA modifie ses caractéristiques intrinsèques et diminue son hydrophilie au profit de la lipophilie de la molécule associée, améliorant ainsi certains paramètres pharmacocinétiques comme la demi-vie plasmatique, la stabilité et l'absorption cellulaire. De plus, étant donné que les siRNA seuls ne présentent pas de ciblage intrinsèque vers des types cellulaires spécifiques, la conjugaison covalente peut être utilisée pour leur conférer des propriétés de ciblage cellulaire spécifique (Dong et al., 2019).

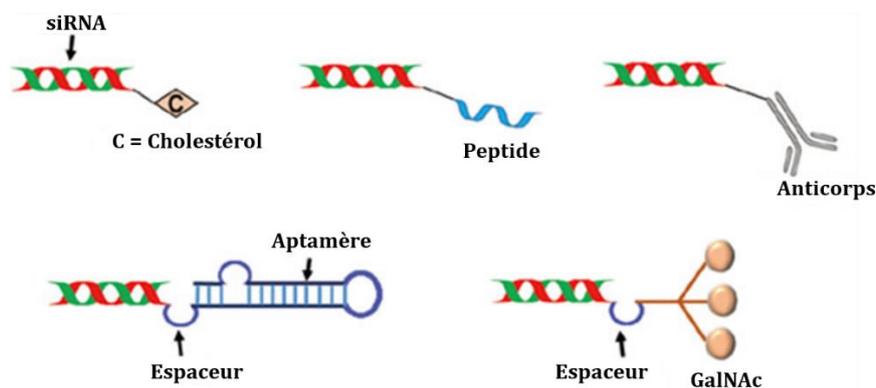


Figure 37 : Exemples de bioconjugaison des siRNA. Espaceur au lieu de linqueur, aptamère,
Image adaptée de (Chandela and Ueno, 2019).

Bien que ces conjugués de siRNA se soient révélés très prometteurs comme système d'administration, la bioconjugaison seule ne protège pas les siRNA de la dégradation par les nucléases sériques *in vivo*, en comparaison aux nanoparticules cationiques. Il faut donc utiliser des conjugués de siRNA avec des oligonucléotides modifiés chimiquement (voir paragraphe précédent) (Kanasty et al., 2013).

Plusieurs molécules ou macromolécules ont été largement utilisées comme le cholestérol, la N-acétyl-galactosamine (GalNAc), les aptamères et les anticorps (Figure 37). Conjugués à des siRNA, ils présentent des caractéristiques différentes qui seront décrites dans les paragraphes suivants.

5.2.2.1 Conjugaison au cholestérol

Les premiers systèmes d'administration à base de conjugués, ayant présenté une efficacité *in vivo*, étaient associés au cholestérol et à d'autres molécules lipophiles (Kanasty et al., 2013). Différents types de lipides peuvent être liés au siRNA pour améliorer la demi-vie plasmatique et l'absorption intracellulaire. L'intérêt du cholestérol est lié à son importance en tant que composant structurel principal de la membrane cellulaire. Conjugué au siRNA, le cholestérol peut favoriser le transport intracellulaire et fournir une résistance aux nucléases *in vivo*. De plus, la capacité du cholestérol à circuler à travers les vaisseaux sanguins favorise l'administration systémique du conjugué cholestérol-siRNA. Dans le sang, l'interaction des bioconjugués cholestérol-siRNA avec les lipoprotéines sériques permet une distribution ciblée aux tissus exprimant le récepteur des lipoprotéines, principalement le foie et les cellules cancéreuses (Chandela and Ueno, 2019).

D'autres conjugués lipophiles, comprenant les acides biliaires et l' α -tocophérol (vitamine E), peuvent être utilisés pour l'administration de siRNA. Les conjugués d'acide biliaire favorisent l'absorption des siRNA *via* l'interaction avec des lipoprotéines telles que la lipoprotéine de haute densité (HDL), qui dirige le siRNA vers le foie, les reins et les organes stéroïdogènes, et la lipoprotéine de basse densité (LDL) qui distribue le siRNA principalement au foie (Roberts et al., 2016).

5.2.2.2 Conjugaison à un dérivé de galactose

Récemment, les conjugués N-acétyl-galactosamine-siRNA (GalNAc-siRNA) ont suscité beaucoup d'intérêt et font partie des systèmes de bioconjugués les plus développés pour l'administration des siRNA. En effet, la plupart des candidats-médicaments à base de siRNA, actuellement en développement clinique, sont des oligonucléotides modifiés par conjugaison au N-acétyl-galactosamine (GalNAc). Ce glucide, un dérivé du galactose, a une affinité de liaison accrue au récepteur des asialo-glycoprotéines (ASGPR) (Figure 38). L'ASGPR, fortement exprimé à la surface des hépatocytes, et conservé parmi les espèces, est un récepteur de lectine de type C, permettant l'élimination des glycoprotéines circulantes dégradées, *via* une endocytose médiée par la clathrine, suivie d'un recyclage des récepteurs. Seulement 15 minutes sont nécessaires pour l'internalisation et le recyclage de l'ASGPR à la surface de la cellule (Weng et al., 2019). Par conséquent, la bioconjugaison de GalNAc guide le siRNA vers les hépatocytes et favorise une accumulation spécifique dans le foie, en ciblant les récepteurs ASGPR (Kanasty et al., 2013).

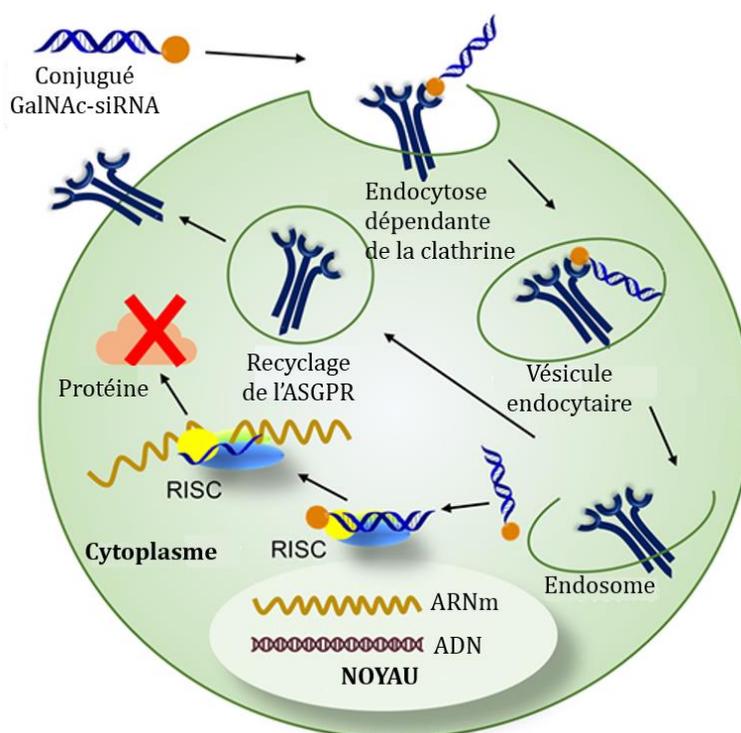


Figure 38 : Administration de siRNA aux hépatocytes médiée par GalNAc / ASGPR.

Le siRNA conjugué au GalNAc est reconnu par un récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGPR), qui déclenche la voie médiée par l'endocytose dépendante de clathrine. Le mécanisme exact d'échappement endosomal n'est pas encore connu. Image adaptée de (Weng et al., 2019).

Les conjugués GalNAc-siRNA sont injectés par voie sous-cutanée et présentent une accumulation hépatique plus élevée par rapport à ceux injectés par voie intraveineuse. Des bioconjugués formés avec des siRNA chimiquement modifiés présentent une stabilité systémique élevée et une pharmacocinétique améliorée. De plus, ils sont capables de réduire, de manière efficace et durable, l'expression du gène cible dans les hépatocytes. La formulation la plus efficace a été développée par Alnylam Pharmaceuticals pour divers types de troubles hépatiques (Wittrup and Lieberman, 2015).

Un système de conjugué GalNAc-siRNA, composé de siRNA chimiquement stabilisé avec un ligand de ciblage trivalent s'est révélé prometteur dans le traitement de plusieurs maladies telles que l'amylose à transthyréline, l'hypercholestérolémie ou encore l'hémophilie. Dans ce système, l'extrémité 3' du brin sens du siRNA est attachée à un trimère de GalNAc au moyen d'un espaceur (Figure 39). Cette multivalence est conçue pour une liaison de haute affinité à l'ASGPR, améliorant ainsi l'absorption cellulaire par les hépatocytes (Ho et al., 2016; Kanasty et al., 2013). Ces nouveaux conjugués siRNA-GalNAc ont présenté une efficacité élevée *in vitro* et *in vivo*, et sont actuellement en cours d'essais cliniques pour le traitement de diverses pathologies (voir Tableau 9 page 157).

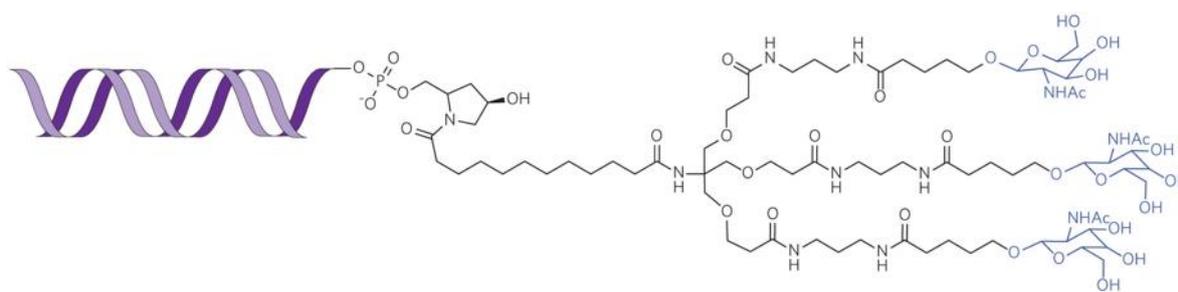


Figure 39 : Conjugué GalNAc-siRNA.

Structure du conjugué trivalent GalNAc-siRNA utilisé dans plusieurs candidats-médicaments d'Alnylam Pharmaceuticals. Image issue de (Kanasty et al., 2013).

5.2.2.3 Conjugaison à un PEG

La PEGylation a été largement appliquée pour l'administration de bio-macromolécules. Le PEG ou polyéthylène glycol est un polymère qui permet de masquer les charges du siRNA. Les conjugués PEG-siRNA ont des niveaux de stabilité plus élevés que le siRNA « nu » *in vitro* en présence de sérum, et des temps de circulation significativement prolongés *in vivo* après injection intraveineuse. De plus, la PEGylation améliore le profil de biodistribution du siRNA avec une accumulation accrue dans le foie, les reins, la rate ainsi que les poumons et une élimination rénale retardée (Roberts et al., 2016).

5.2.2.4 Conjugaison aux aptamères

Les aptamères sont des oligonucléotides (ADN ou ARN) simple brin court avec une structure tridimensionnelle unique (Figure 37). Ils peuvent se lier spécifiquement à diverses petites molécules avec une affinité élevée. Leur interaction avec les cibles est similaire aux interactions antigène-anticorps, permettant l'absorption par des cellules spécifiques lorsque le récepteur ciblé est exprimé. L'utilisation des aptamères pour l'administration de siRNA est facilitée par l'interaction de ces aptamères avec les protéines membranaires. Les conjugués aptamère-siRNA sont formés par conjugaison non covalente et leur absorption intracellulaire a lieu *via* une endocytose médiée par les récepteurs. Ces conjugués ont provoqué une inhibition génique efficace *in vitro* et *in vivo*. Ils ont un faible coût de production, une toxicité et une immunogénicité minimales (Chandela and Ueno, 2019; Chen et al., 2018).

L'utilisation d'un conjugué aptamère-siRNA a été décrite pour la première fois en 2006. Des siRNA, ciblant des gènes oncogènes ou anti-apoptotiques, ont été liés à l'aptamère A10, ciblant l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA) surexprimé par les cellules cancéreuses de la prostate. Ces conjugués ont présenté une activité anti-cancéreuse efficace (McNamara et al., 2006). Cependant, malgré des résultats prometteurs dans différentes maladies, aucun essai clinique utilisant des conjugués d'aptamères-siRNA n'est actuellement

en cours. Cela pourrait s'expliquer par le manque d'études pharmacocinétiques / pharmacodynamiques approfondies et les interactions non spécifiques avec les protéines sériques.

5.2.2.5 Conjugaison aux peptides à pénétration cellulaire (CPP)

Les CPP sont des peptides cationiques et / ou amphipathiques, de moins de 30 acides aminés, qui possèdent la capacité de traverser la membrane plasmique. Ils peuvent se lier aux siRNA, de manière non covalente grâce à des interactions électrostatiques, pour produire un complexe cationique global. Cette complexation rend moins nécessaire la modification chimique du siRNA, préservant ainsi son activité et réduisant les procédures de purification. Ces complexes présentent une charge globale positive qui aide à traverser la membrane cellulaire et se sont également révélés utiles dans le relargage endosomal (Cavallaro et al., 2017).

Les CPP et les siRNA peuvent également former des liaisons covalentes par le biais de liaisons disulfures, qui sont clivées dans le cytoplasme. Ces conjugaisons covalentes semblent améliorer l'absorption cellulaire. Cependant, la génération de conjugués covalents purs entre les CPP cationiques et les siRNA anioniques peut entraîner des agrégations *in vivo* (Cavallaro et al., 2017; Roberts et al., 2016).

Le CPP le plus étudié est le peptide activateur transcriptionnel trans-activateur (TATp) dérivé du domaine de transduction des protéines (PTD) du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), il est riche en acides aminés chargés positivement comme l'arginine ou la lysine. L'administration des conjugués TAT-siRNA a entraîné une localisation péri-nucléaire des siRNA et une activité inhibitrice efficace (Chiu et al., 2004). Des peptides amphipathiques constitués de lysine et d'arginine, ainsi que des peptides riches en histidine se sont également révélés efficaces pour la distribution des siRNA (Crombez et al., 2009; Kichler et al., 2013; Langlet-Bertin et al., 2010).

Malgré des résultats prometteurs *in vitro*, les conjugués CPP-siRNA peuvent induire des réponses immunitaires non spécifiques *in vivo* avec une augmentation significative de l'expression de l'IFN- α , du TNF- α et de l'IL-12. Pour cela, la toxicité associée au peptide doit être prise en compte lors de la conception des conjugués CPP-siRNA (Roberts et al., 2016).

❖ Limites communes aux bioconjugués de siRNA

Malgré leurs nombreux avantages en tant qu'agents thérapeutiques, les bioconjugués de siRNA peuvent présenter certains inconvénients limitant leur utilisation en clinique. Ces conjugués présentent de faibles efficacités d'inhibition *in vitro*, ce qui peut empêcher leur développement en préclinique et clinique. De plus, ils présentent un coût élevé de production

à grande échelle pour obtenir suffisamment de siRNA bioconjugués pour le développement clinique. Enfin, en raison de leur exposition aux enzymes sériques et aux cellules du système immunitaire (monocytes, macrophages, cellules de Kupffer), ces bioconjugués présentent une biodistribution plus faible par rapport aux nanoparticules lipidiques ou polymériques, ce qui conduit à injecter des doses plus élevées de siRNA (Caillaud et al., 2020; Lee et al., 2017). Une étude a démontré qu'une dose de 50 mg / kg des siRNA conjugués au cholestérol doit être utilisée pour une inhibition génique *in vivo* contre 1–2,5 mg / kg pour des systèmes à base de liposomes (Lee et al., 2016).

5.2.3 La vectorisation physique

Une large diversité de matériaux a été explorée pour relever les défis de l'administration *in vivo* des siRNA, et les nanoparticules cationiques à base de lipides ou de polymères, représentent le choix le plus couramment utilisé. La nature polyanionique du siRNA lui permet de former des complexes avec des lipides ou des polymères cationiques *via* des interactions électrostatiques. En plus de la complexation, la nature cationique de ces vecteurs contribue, dans la plupart des cas, à l'interaction avec les membranes cellulaires chargées négativement.

5.2.3.1 Les nanoparticules à base de polymères

Les polymères ont été étudiés en tant que vecteurs non viraux de siRNA en raison de leurs diverses caractéristiques physico-chimiques et de la flexibilité de leur structure, ce qui permet une modification facile pour affiner leurs propriétés. Ainsi, le poids moléculaire, la densité de charge, la structure de la chaîne latérale, l'hydrophobicité et le rapport molaire polymère-ARN peuvent être ajustés, pour optimiser l'apport de siRNA aux cellules cibles. De plus, divers groupes chimiques peuvent être attachés aux polymères, modifiant leurs paramètres intrinsèques et leur conférant de nouvelles propriétés. Contrairement aux nanoparticules lipidiques, les vecteurs polymériques ne contiennent que des polymères cationiques sans groupement hydrophobe, et sont entièrement solubles dans l'eau (Ho et al., 2016).

Ces polymères, *via* des interactions électrostatiques, favorisent la condensation des siRNA pour former des complexes appelés polyplexes. Une fois complexés, les siRNA se sont révélés résistants aux nucléases, permettant ainsi de prolonger leur temps de circulation. Les polyplexes peuvent être absorbés par endocytose non spécifique *via* des interactions électrostatiques avec la membrane, et faciliteraient la perturbation de l'endosome *via* l'effet d'éponge à protons. En effet, il a été proposé que les groupements amines des polymères cationiques possèderaient un fort pouvoir tampon lorsqu'ils sont piégés dans l'environnement endosomal acide. Cette propriété pourrait entraîner une accumulation d'ions dans l'endosome, entraînant un gonflement osmotique provoquant la rupture de la membrane endosomale et la

libération de son contenu piégé (Chandela and Ueno, 2019; Ho et al., 2016). On peut distinguer deux catégories de polymères : les polymères synthétiques et les polymères naturels.

5.2.3.1.1 Les polymères synthétiques

Les polymères synthétiques présentent un intérêt pour des applications thérapeutiques car leurs propriétés structurelles et chimiques sont connues. Ces polymères peuvent être linéaires ou ramifiés et fonctionnalisés de diverses manières. En raison de leur petite taille, les polymères cationiques forment généralement des complexes avec les siRNA de manière plus efficace que les lipides. De plus, étant donné qu'ils sont principalement synthétiques, leurs caractéristiques (taille, ramification et composition personnalisée) peuvent être facilement modifiées. Cependant, l'inconvénient majeur réside dans les effets secondaires indésirables associés à la biocompatibilité et la bioactivité. Les polymères les plus couramment utilisés sont la polyéthylèneimine (PEI), le L-lactide-co-glycolide (PLGA), le PEG, la Poly-L-lysine (PLL), et le PLA (Roberts et al., 2016).

❖ Polyéthylèneimine (PEI)

La polyéthylèneimine (PEI) est le polymère le plus efficace et le plus couramment utilisé pour l'administration d'oligonucléotides y compris les siRNA. La PEI présente une encapsulation importante des siRNA, une bonne interaction avec la membrane cellulaire, favorisant ainsi l'absorption cellulaire, et un taux de relargage endosomal élevé par « effet d'éponge à protons ». Les PEI de haut poids moléculaire sont plus efficaces, dans la distribution des siRNA, que les PEI de faible poids moléculaire, en raison de leur forte densité de charge créant une liaison importante avec les siRNA, les protégeant ainsi de la dégradation enzymatique. La PEI de faible poids moléculaire (25 kDa) est généralement utilisée *in vitro* pour la transfection d'acide nucléique (Caillaud et al., 2020).

La PEI ramifiée présente une grande capacité de complexation avec les siRNA grâce à sa structure flexible, au nombre accru de charges par volume et aux multiples options de repliement, augmentant ainsi la distribution des siRNA aux cellules cibles par rapport à la PEI linéaire (Chandela and Ueno, 2019; Dong et al., 2019).

Malgré leur efficacité *in vitro*, les nanoparticules de siRNA à base de PEI ont une activité limitée *in vivo*, en raison de la toxicité associée au vecteur ainsi qu'aux interactions non spécifiques avec les protéines sériques lors de l'administration systémique. De plus, la liaison aux immunoglobulines favorise la reconnaissance des nanoparticules par les cellules du système réticulo-endothélial et leur élimination rapide de la circulation sanguine. Une cytotoxicité retardée a également été observée, après internalisation cellulaire de particules à base de

PEI, se manifestant par une réduction de la taille des cellules, la diminution du nombre de mitoses et la vacuolisation du cytoplasme. Afin de réduire la toxicité et améliorer les paramètres pharmacocinétiques, tout en conservant la puissante capacité de transfection, une des stratégies consiste à protéger la densité de charge élevée des polyplexes par un revêtement PEG, réduisant ainsi les interactions non spécifiques. Cependant, la PEGylation limite l'internalisation cellulaire ainsi que le relargage endosomal (voir PEGylation). Il a également été décrit que la modification de la PEI avec des composants neutres ou anioniques, ainsi que les modifications hydrophobes réduisent les effets cytotoxiques et améliorent la distribution des siRNA. Une autre approche consiste à modifier les systèmes polymériques avec des peptides, par exemple *via* l'inclusion de trimères de tyrosine, afin de diminuer la dose efficace du polymère et améliorer l'internalisation cellulaire et le relargage endosomal (Dong et al., 2019; Roberts et al., 2016)

❖ Dendrimères

Les dendrimères sont des petites structures globulaires compactes biocompatibles, de nature cationique avec un faible indice de polydispersité. Ils sont caractérisés par de multiples monomères ramifiés avec de nombreux groupes amine à la surface et un noyau central (Figure 40.A). Ils ont été étudiés pour la vectorisation de siRNA grâce à leur forte affinité de liaison aux acides nucléiques, et à leur amélioration de l'efficacité des siRNA. Les dendrimères les plus couramment utilisés pour former des complexes avec les siRNA appelés dendriplexes sont les dendrimères poly (amidoamine) (PAMAM) et poly (propylèneimine) (PPI) (Chandela and Ueno, 2019).

Lorsqu'ils sont introduits dans la circulation sanguine, les dendriplexes entraînent une toxicité en raison de leur manque de biodégradabilité et leur interaction avec les composants sériques (protéines et cellules). Une des stratégies pour réduire la toxicité de ces nanoparticules et améliorer leur caractéristiques pharmacocinétiques est la PEGylation (Adesina and Akala, 2015). Les siRNA formulés avec des dendrimères PAMAM PEGylés se sont révélés résistants aux nucléases et ont présenté une inhibition élevée de l'expression génique *in vitro*. Les dendrimères peuvent également être utilisés avec des peptides ou des anticorps spécifiques pour une administration spécifique aux cellules cibles (Senel and Buyukkoroglu, 2019). Comme pour les autres polymères, la stratégie d'incorporation de molécules comprenant des lipides ou des peptides qui peuvent favoriser la libération endosomale du siRNA a également été explorée. Ces molécules sont capables de fusionner avec les membranes endosomales et perturber l'organisation de la bicouche entraînant la formation de pores et la libération des systèmes polymériques de l'endosome (Ho et al., 2016).

5.2.3.1.2 Les polymères naturels

Les polymères cationiques naturels sont abondants et sont similaires aux composants des MEC biologiques. Ils sont considérés comme plus sûrs pour la vectorisation des oligonucléotides en raison de leur importante biocompatibilité. Ils comprennent des protéines, des polyesters et des polysaccharides comme le chitosane ou la cyclodextrine.

❖ Chitosane

Le polysaccharide chitosane est un dérivé de la chitine, trouvée dans l'exosquelette des crustacés. Comme la plupart des polysaccharides, le chitosane est un polymère biocompatible et biodégradable, avec de faibles propriétés immunogènes. De plus, le chitosane est peu coûteux et présente une faible cytotoxicité. Sa nature polycationique, due à la présence de groupements amines primaires ($pK_a \approx 6$), favorise l'interaction avec les siRNA et la formation de polyplexes. La présence de différents groupes fonctionnels (carboxyle, hydroxyle, amine), dans la structure du chitosane, constitue un atout majeur pour sa fonctionnalisation, permettant d'obtenir une hétérogénéité structurale, mais aussi des copolymères. Il a été montré que le chitosane de haut poids moléculaire offre une meilleure complexation avec les siRNA et une stabilité accrue, tandis que le chitosane de plus faible poids moléculaire, avec des degrés spécifiques de désacétylation, offre une meilleure libération intracellulaire des siRNA (Dong et al., 2019; Senel and Buyukkoroglu, 2019).

Cependant, l'efficacité de transfection *in vitro* du chitosane est plus faible comparé à la PEI. *In vivo*, l'utilisation du chitosane seul ne permet pas de protéger les siRNA de la dégradation, réduisant ainsi leur efficacité. Une modification de sa structure est nécessaire pour améliorer ses caractéristiques *in vivo*. Pour cela, la PEGylation peut améliorer la solubilité et la stabilité du chitosane dans les milieux biologiques et réduit les interactions non spécifiques (Senel and Buyukkoroglu, 2019). Une autre approche est la modification du chitosane par des polypeptides qui pourraient augmenter l'efficacité des nanoparticules et améliorer le relargage endosomal (Forouzanfar et al., 2016). Enfin, la conjugaison des nanoparticules de chitosane à des anticorps peut augmenter le ciblage des siRNA vers des cellules spécifiques (Gu et al., 2017).

❖ Cyclodextrine

Le premier polymère utilisé dans des essais cliniques chez l'humain, pour l'administration de siRNA, était basé sur la cyclodextrine (CDP). Les cyclodextrines sont des oligosaccharides d'origine naturelle, cycliques neutres. Bien que les nanocomplexes composés uniquement de CDP et de siRNA aient pu assurer une administration efficace *in vitro*, ces complexes

nécessitent des composants supplémentaires pour la stabilisation et l'efficacité *in vivo* (Roberts et al., 2016).

L'équipe du Pr. Davis a donc réalisé des modifications chimiques sur les polymères de CDP, pour les rendre cationiques, permettant leur complexation avec les siRNA. Le système d'administration utilisé, pour le traitement du mélanome, se composait de : (i) une CDP linéaire soluble dans l'eau, (ii) un conjugué adamantane - PEG (AD – PEG), (iii) un peptide conjugué pour le ciblage des cellules tumorales et (iv) le siRNA (Figure 40.B) (Davis et al., 2010). L'adamantane est une molécule hydrophobe qui forme un complexe d'inclusion stable avec le noyau cyclique de la structure de la CDP, et qui permet la fixation du PEG à la surface de la particule. L'ajout de fragments PEG a amélioré la stabilisation des nanoparticules *in vivo*, empêchant l'agrégation avec les protéines sériques (Pun and Davis, 2002). La conjugaison avec un peptide spécifique (la transferrine) a favorisé le ciblage des cellules tumorales (Bellocq et al., 2003). L'administration *in vivo* de ces nanoparticules fonctionnalisées a montré qu'elle peuvent faciliter la distribution des siRNA, y compris chez l'humain, avec une activité inhibitrice importante sans induire de toxicité ou de stimulation du système immunitaire (Hu-Lieskovan et al., 2005). Des groupes imidazole peuvent également être incorporés aux extrémités des polymères de CDP permettant de tamponner le pH endocytaire et de favoriser l'échappement de l'endosome améliorant ainsi l'efficacité de la nanoparticule pour transfecter le siRNA (Bartlett and Davis, 2007; Hu-Lieskovan et al., 2005; Mishra et al., 2006). Par la suite, plusieurs autres groupes ont utilisé des systèmes similaires à base de cyclodextrine modifiée pour l'administration de siRNA (Kanasty et al., 2013).

Malgré de nombreuses années de développement, l'utilisation des polyplexes pour la vectorisation de siRNA *in vivo* a été limitée. Peu de polymères ont été utilisés *in vivo* et un nombre encore plus faible d'entre eux ont atteint des stades cliniques en raison de leur tolérance limitée (Roberts et al., 2016).

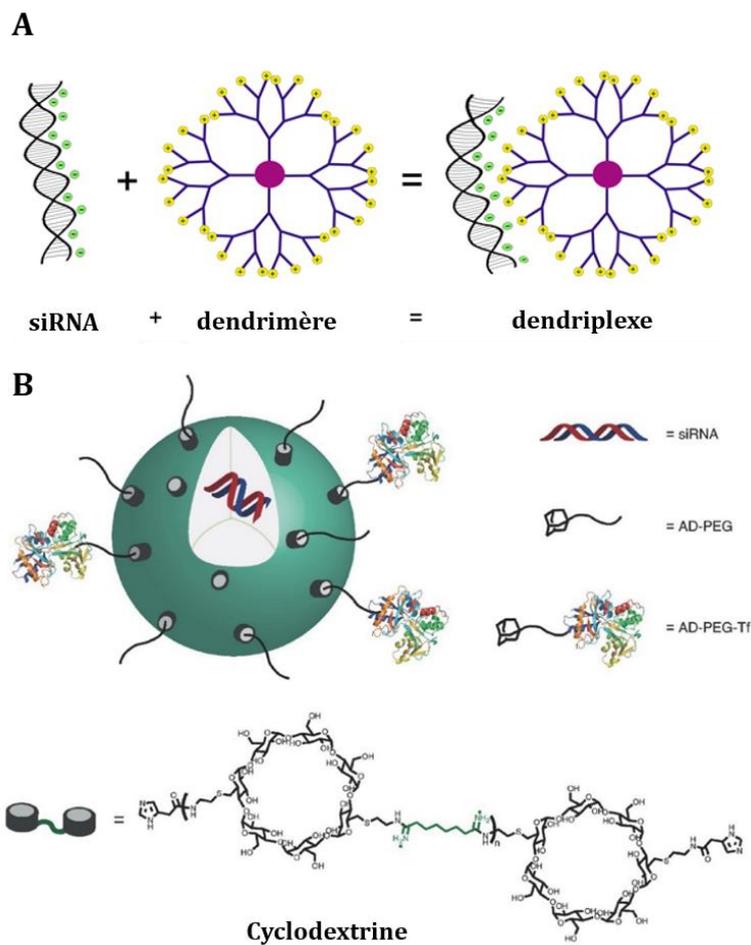


Figure 40 : Schéma des systèmes d'administration polymériques de siRNA.

A) Dendrimère. B) Cyclodextrine. Le système d'administration à base de cyclodextrine contient un polymère cationique contenant de la cyclodextrine (CDP), un conjugué adamantane (AD)-PEG (AD-PEG), un fragment de ciblage de la transferrine humaine (Tf) conjugué à AD-PEG (AD-PEG-Tf) et le siRNA. Image adaptée de (Chandela and Ueno, 2019; Ferenc et al., 2013).

5.2.3.2 Les nanoparticules lipidiques

Les nanoparticules lipidiques (NPL) représentent actuellement les principaux systèmes non viraux utilisés pour l'administration de siRNA. La membrane cellulaire étant principalement constituée de lipides et de phospholipides, les NPL ont naturellement tendance à bien interagir avec la membrane plasmique pour l'absorption cellulaire. De plus, le risque de réactions immunogènes indésirables aux lipides est inférieur à celui de la plupart des matériaux polymères, qui ont des poids moléculaires plus élevés. Les NPL possèdent généralement un diamètre inférieur à 100 nm. De nombreux lipides et phospholipides biocompatibles et biodégradables peuvent être appliqués pour créer des NPL. Les deux principaux groupes de NPL sont les lipoplexes et les particules lipidiques d'acide nucléique stables (SNALP) (Roberts et al., 2016).

5.2.3.2.1 Les liposomes

Un liposome est composé de lipides amphiphiles qui s'auto-assemblent spontanément, en solution aqueuse et au-dessus d'une certaine concentration vésiculaire critique, pour former une vésicule sphérique uni ou multi-lamellaire avec un noyau aqueux entouré par une ou plusieurs bicouches lipidiques (Figure 41). Les liposomes diffèrent des micelles qui ont un noyau huileux interne (Oliveira et al., 2019).

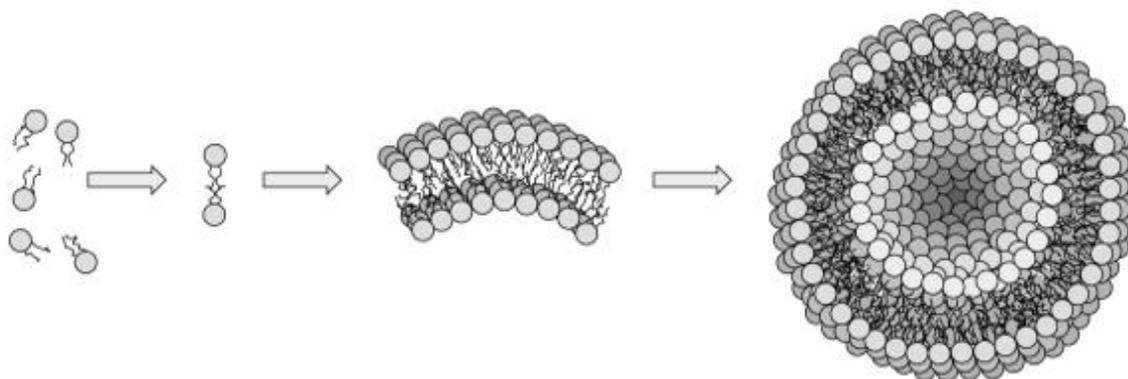


Figure 41 : Structure d'un liposome.

Image issue de (Balazs and Godbey, 2011).

La nature amphipathique des liposomes permet l'encapsulation d'une large gamme de médicaments hydrophiles et hydrophobes. Ainsi, ils sont capables de piéger des substances hydrophiles dans le compartiment aqueux interne et des composés lipophiles dans la bicouche lipidique. En tant qu'analogues des membranes biologiques, les liposomes sont biocompatibles, biodégradables, non-immunogènes et peuvent fusionner avec la membrane plasmique chargée négativement, et libérer le matériel génétique dans le cytoplasme. De plus, ils présentent une efficacité d'encapsulation importante et une faible toxicité (Oliveira et al., 2019).

Les liposomes peuvent être utilisés pour encapsuler des siRNA dans leur cœur aqueux. En effet, des liposomes composés de DOPC (*1,2-dioleoylsn-glycero-3-phosphatidylcholine*) (Figure 43) ont été utilisés pour l'administration *in vivo* d'un siRNA ciblant EphA2, un récepteur de tyrosine kinase qui joue un rôle important dans le cancer des ovaires. Cette formulation s'est révélée très efficace pour réduire l'expression d'EphA2, 48h après l'administration *in vivo* d'une dose unique. Cela s'est traduit par une inhibition de la croissance tumorale dans un modèle de carcinome ovarien sans induire de toxicité (Landen et al., 2005). Un essai clinique est actuellement en cours afin d'évaluer l'efficacité de cette formulation pour des tumeurs solides (NCT01591356).

5.2.3.2.2 Les lipoplexes

Les lipoplexes sont des complexes composés de lipides cationiques et d'acide nucléiques (ADN, ARN, siRNA) formés grâce aux interactions électrostatiques qui s'établissent entre les charges positives des lipides cationiques et les charges négatives des acides nucléiques (Felgner et al., 1997). Les lipoplexes sont caractérisés par une structure multi-lamellaire de bicouches lipidiques chargées positivement d'environ 3,7 nm d'épaisseur, espacées de ~ 2 nm les unes des autres par des acides nucléiques chargés négativement (Oliveira et al., 2019; Schroeder et al., 2010) (Figure 42).

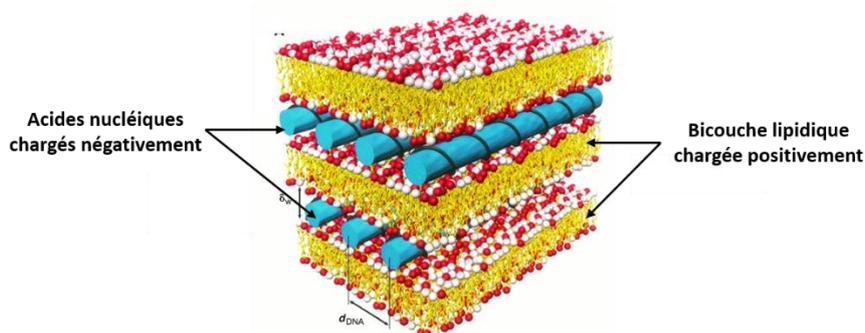


Figure 42 : Structure multilamellaire des lipoplexes à base de lipides cationiques et d'acide nucléique. Image schématique de la disposition des lipides cationiques et des acides nucléiques l'intérieur des lipoplexes. Image issue de (Rädler et al., 1997).

Les lipoplexes améliorent la stabilité des siRNA et facilitent les interactions avec les membranes et donc l'absorption cellulaire permettant ainsi de réduire, de manière considérable, la dose de siRNA pour une inhibition génique efficace (Scherman et al., 2017). De plus, ils offrent une biocompatibilité, une bonne tolérance, de bonnes propriétés pharmacocinétiques, ainsi qu'une facilité de production pour les applications cliniques (Oliveira et al., 2019).

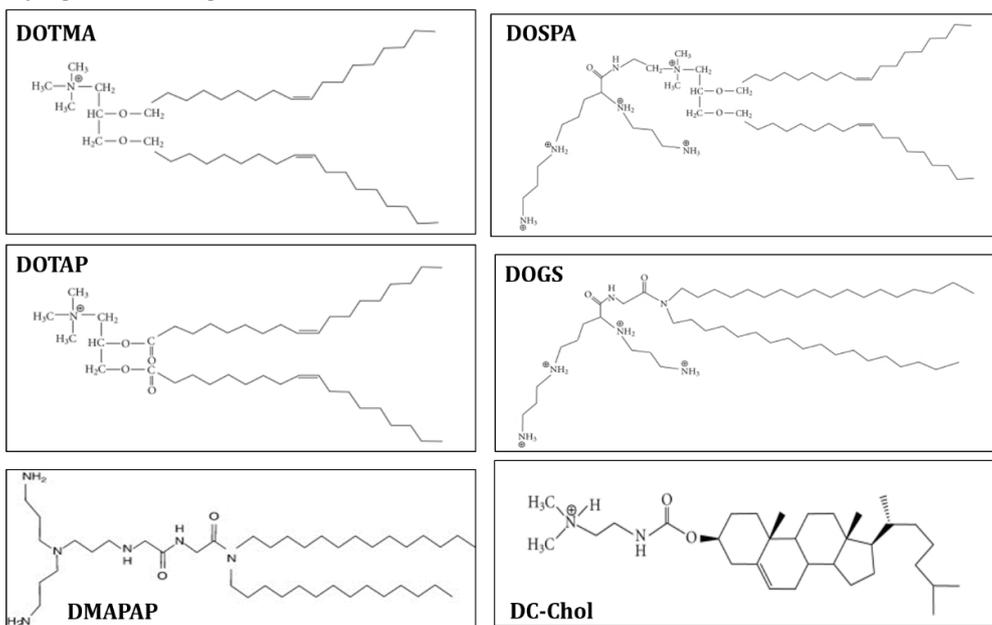
❖ Les lipides cationiques monovalents

Les lipides cationiques utilisés pour la thérapie génique sont composés de trois domaines de base : une tête polaire chargée positivement, une chaîne hydrophobe, et un espaceur qui joint les régions polaires et non polaires. La capacité des lipides cationiques à vectoriser de l'acide nucléique, initialement avec de l'ADN, a été démontrée en 1987 par Felgner et ses collaborateurs. Le premier lipide cationique qui a été utilisé pour l'administration d'un plasmide codant un gène est le DOTMA (N-[1-(2,3-dioléoxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chlorure) (Figure 43) (Felgner et al., 1987). Ce lipide cationique peut former des liposomes soit seul, soit en présence d'autres lipides. Ces liposomes peuvent être réduits en petites vésicules uni-lamellaires (SUV) d'un diamètre <100 nm (Schroeder et al., 2010). Le DOTAP (1,2-

dioléoyl-3-triméthylammonium-propane), un autre lipide cationique s'est révélé efficace pour l'administration *in vivo* d'un siRNA ciblant le TNF- α (Sørensen et al., 2003).

La nature du groupement cationique influe la capacité de condensation et de protection des acides nucléiques, la cytotoxicité associée aux lipides ainsi que l'efficacité globale de transfection. Il a été décrit que la chaîne hydrophobe contribue au maintien de l'auto-agrégation des lipides cationiques et que sa longueur ainsi que la présence ou pas de saturation influe l'activité biologique de ces derniers. De plus, la nature de l'espaceur (par exemple éther, ester, carbamate ou amide) influe la flexibilité conformationnelle, le degré de stabilité et la biodégradabilité du lipide cationique. Ainsi, les groupements éthers, chimiquement stables, semblent améliorer l'efficacité de transfection. Cependant, comme ils sont non-biodégradables, ils peuvent provoquer une toxicité plus élevée, par rapport aux esters qui, eux, sont biodégradables et moins toxiques mais pas très stables, ce qui peut diminuer l'efficacité de transfection (Oliveira et al., 2019). La Figure 43 illustre la structure des principaux lipides utilisés pour la transfection des siRNA.

1) Lipides cationiques



1) Lipides zwitterioniques

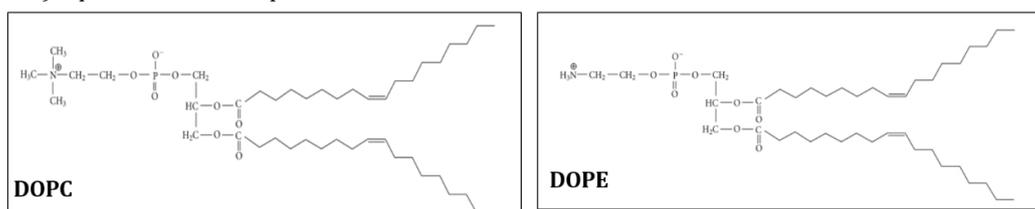


Figure 43 : Structures des différents lipides utilisés pour la transfection d'acides nucléiques.
Image adaptée de (Balazs and Godbey, 2011; Rhinn et al., 2009).

Cependant, l'affinité de liaison des siRNA pour les lipides cationiques est faible, en raison de la petite taille des siRNA et leur faible densité de charge, ce qui se traduit par une faible efficacité d'encapsulation des siRNA (<40%), et des lipoplexes moins compacts que les lipoplexes contenant de l'ADN plasmidique et donc moins stables *in vivo*, avec une efficacité de transfection limitée (Fonseca et al., 2018; Kulkarni et al., 2018).

Pour améliorer la stabilité, des quantités plus élevées de lipides cationiques ont été utilisées. Néanmoins, en raison de l'augmentation du nombre de charges positives, cette stratégie peut entraîner une cytotoxicité dose-dépendante, qui inclue le rétrécissement des cellules, la réduction du nombre de mitoses et la vacuolisation du cytoplasme. Des effets hors cible comme l'activation du système du complément et les réponses immunitaires ou inflammatoires peuvent également être induits. De plus, cette charge de surface hautement positive du complexe induit de fortes interactions non spécifiques avec les protéines sériques chargées négativement, déclenchant une élimination rapide par le système réticulo-endothélial (Fonseca et al., 2018).

❖ Les lipides cationiques multivalents

Pour améliorer l'administration des siRNA *in vivo*, et diminuer la toxicité des lipoplexes, une stratégie consiste à remplacer les lipides cationiques monovalents comme le DOTAP par des nouveaux lipides cationiques multivalents comme le DOSPA (2,3-dioléyloxy-N-[2 (sperminocarboxamido) éthyl] -N, N-diméthyl-1- trifluoroacétate de propanaminium) (Figure 43) ou le lipide pentavalent MVL5 (N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-aminopropyl)amino]butylcarboxamido)ethyl]-3,4-di[oleyl]-benzamide). Ces nouveaux lipides fournissent une efficacité de complexation améliorée tout en réduisant la charge cationique par liposome, et donc la toxicité. Cependant, la forte interaction entre le siRNA et les lipides multivalents peut compromettre la libération du siRNA dans le cytoplasme après relargage endosomal (Caillaud et al., 2020; Fonseca et al., 2018).

❖ Les lipides auxiliaires

Une stratégie alternative pour surmonter les limitations associées à l'administration systémique de nanoparticules chargées positivement, est l'incorporation de lipides neutres dans les lipoplexes. Ces derniers présentent une faible interaction avec les protéines sériques augmentant ainsi le temps de circulation et diminuant la toxicité (Fonseca et al., 2018). De plus, ces lipides appelés « lipides auxiliaires » tels que la 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DOPE), dont la structure est représentée dans la Figure 43, ou le cholestérol facilitent la complexation des siRNA.

Grâce à sa caractéristique fusogénique, la DOPE contribue à la libération du siRNA dans le cytosol par dégradation de la membrane endosomale, ce qui explique son utilisation courante dans la formulation des lipoplexes. En effet, à pH neutre ou basique, la DOPE forme une bicouche lipidique organisée et stable. Cependant, dans un environnement acide, tel que la voie endocytaire, sa stabilité diminue, conduisant à une perturbation du liposome, et à une fusion avec la membrane endocytaire. D'autres lipides neutres sont fréquemment utilisés, pour améliorer la stabilité et l'efficacité de transfection, comme la DOPC (Figure 43) qui réduit la toxicité cellulaire ou encore le cholestérol qui augmente la stabilité sérique et favorise la fusion membranaire et le relargage endosomal (Hosseini et al., 2019; Pozzi et al., 2012).

❖ L'ajout d'un adjuvant anionique

Les lipides cationiques ont été initialement développés pour l'administration d'ADN. Cependant, il existe des différences importantes entre le siRNA et l'ADN, notamment la taille et la charge globales du siRNA qui sont inférieures à celles de l'ADN. De plus, le siRNA doit atteindre le cytosol pour obtenir un effet thérapeutique, tandis que l'ADN doit traverser la membrane nucléaire pour être efficace (Schroeder et al., 2010).

Afin de favoriser l'autoassemblage du siRNA avec les lipides cationiques, et augmenter ainsi l'efficacité d'encapsulation, notre équipe a développé une nouvelle formulation pour l'administration de siRNA, en incorporant dans le lipoplexe un adjuvant de type polymère anionique. Cette procédure conduit à la formation de complexes plus efficaces permettant l'extinction spécifique de l'expression génique *in vitro*, en utilisant une concentration réduite en siRNA (Rhinn et al., 2009).

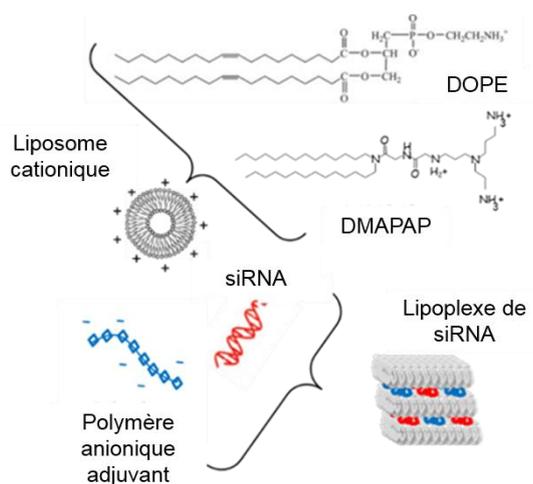


Figure 44 : Représentation schématique de la formation de lipoplexes à base de liposome cationique et de polymère anionique.

Image issue de (Arruda et al., 2019).

Dans un premier temps, l'adjuvant anionique était un ADN plasmidique dépourvu de cassette d'expression. Cette formulation, contenant le liposome DMAPAP (2-(3-[Bis-(3- amino- propyl)- amino]-propylamino)-N-ditetradecylcarbamoylethyl- acétamide) / DOPE et l'ADN (Figure 44), a démontré son efficacité dans plusieurs modèles animaux notamment pour l'administration systémique d'un siRNA ciblant le TNF- α , rétablissant ainsi l'équilibre immunologique dans un modèle murin d'arthrite (Khoury et al., 2006). Cette même formulation a été utilisée pour l'administration d'une combinaison de trois siRNA ciblant trois interleukines différentes (IL-1, IL-6 et IL-18), dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde. Les injections hebdomadaires de ces lipoplexes se sont révélées efficaces pour réduire, de manière significative, l'inflammation et les principales caractéristiques pathologiques de la maladie (Khoury et al., 2008).

Cependant, l'ADN n'est pas une molécule inerte, son utilisation comme adjuvant anionique dans la formulation des lipoplexes ne peut être envisageable pour une application clinique, en raison du risque lié aux séquences codantes susceptibles de conduire à une expression indésirable *in vivo*. De plus, l'incorporation d'une forte dose d'ADN plasmidique dans les lipoplexes peut induire une toxicité cellulaire importante. Pour cela, notre équipe a remplacé l'ADN plasmidique par d'autres polymères anioniques déjà utilisés en clinique. Considérés comme non toxiques et biodégradables, l'ajout de ces derniers dans les lipoplexes a permis une diminution de la toxicité cellulaire et une amélioration de l'efficacité d'inhibition génique par le siRNA. Parmi les sept polymères anioniques testés (Figure 45), le polyglutamate et l'alginate se sont révélés les plus efficaces *in vitro*. L'administration *in vivo* de lipoplexes de siRNA préparés avec le polyglutamate, le polymère le plus utilisé dans les applications biomédicales et pharmaceutiques, a induit une accumulation significativement accrue des siRNA dans le foie et les poumons par rapport aux lipoplexes sans polymère (Schlegel et al., 2011).

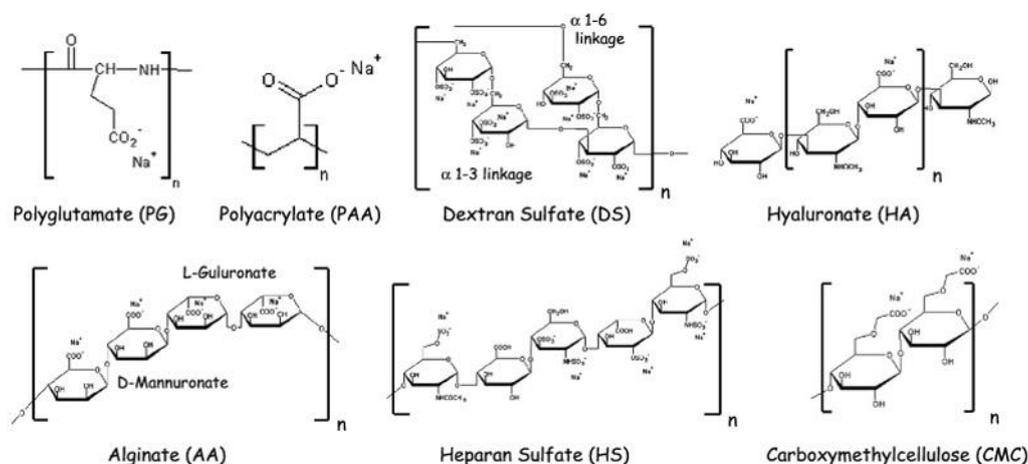


Figure 45 : Représentation schématique des polymères anioniques ajoutés dans les lipoplexes de siRNA. Image issue de (Schlegel et al., 2011).

Récemment, notre équipe a caractérisé les lipoplexes préparés avec l'alginate de sodium comme adjuvant anionique, et a montré qu'ils présentaient un aspect microscopique distinct et une meilleure homogénéité (Figure 46). Les siRNA étaient moins exposés dans ces lipoplexes innovants comparés aux lipoplexes sans polymère anionique ajouté. Ces vecteurs développés ne semblent pas présenter plus de toxicité *in vitro* ni *in vivo*, tout en ayant une efficacité d'extinction génique *in vitro* beaucoup plus élevée. L'alginate de sodium semble donc jouer un rôle clé en structurant et en renforçant les lipoplexes de siRNA, conduisant à un vecteur d'administration plus stable et plus efficace (Arruda et al., 2019).

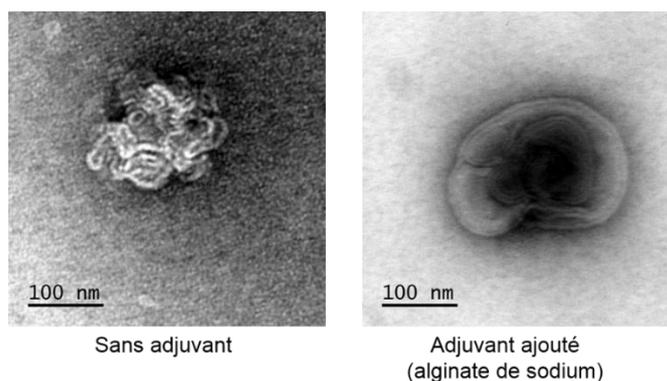


Figure 46 : Structure de lipoplexes de siRNA avec ou sans adjuvant ajouté, imagés par microscopie électronique à transmission.

Image issue de (Arruda et al., 2019).

❖ La PEGylation

Pour améliorer la stabilité des nanoparticules, une des stratégies les plus couramment utilisées consiste à enrober le liposome avec du polyéthylène glycol (PEG). La PEGylation confère au lipoplexe une charge de surface neutre et permet de réduire les interactions non spécifiques avec les composants sériques et de minimiser l'élimination médiée par les cellules du système réticulo-endothélial, augmentant ainsi la demi-vie des siRNA. La PEGylation diminue également l'immunostimulation et augmente l'efficacité d'inhibition génique par les siRNA. L'utilisation de lipides cationiques, combinée à un revêtement PEG, a permis à des candidats prometteurs d'atteindre le stade des essais cliniques pour la thérapie de différentes pathologies (Fonseca et al., 2018).

Cependant, excepté les sites où la barrière endothéliale est fenestrée, comme le foie, la rate et certaines tumeurs, l'augmentation de la taille des nanoparticules PEGylées empêche l'absorption dans certains organes entourés d'endothélium continu. De plus, l'utilisation du PEG peut induire la production d'anticorps IgM, dans le cadre d'une réponse immunitaire. Par conséquent, une élimination sanguine accélérée des nanoparticules est observée lors d'une deuxième administration de liposomes PEGylés, affectant ainsi l'accumulation du siRNA dans

l'organe cible. De plus, selon la longueur de la chaîne acyle du lipide d'ancrage et du poids moléculaire du fragment PEG, ce dernier peut limiter le contact nanoparticule-membrane. Ainsi, une concentration élevée de chaînes polymères pourrait réduire l'internalisation cellulaire des liposomes, limiter l'échappement endosomal du siRNA et donc diminuer son activité (Fonseca et al., 2018).

❖ **La fonctionnalisation de surface**

Malgré l'amélioration significative des paramètres pharmacocinétiques par la PEGylation, cela n'empêche pas l'accumulation des vecteurs de siRNA dans le système réticulo-endothélial. Par conséquent, la fonctionnalisation en surface de nanoparticules, avec des ligands qui seront reconnus spécifiquement par les cellules cibles, est une stratégie qui pourrait augmenter l'efficacité thérapeutique et la sécurité des médicaments à base de siRNA. Ce ciblage permet d'atteindre différents organes et/ou un type cellulaire spécifique dans un tissu (Fonseca et al., 2018). Un bon exemple est le liposome couplé à la vitamine A pour cibler les HSCs dans le foie (Sato et al., 2008b), cet exemple est décrit en détail dans le chapitre IV, paragraphe 2.1).

5.2.3.2.3 Les particules lipidiques d'acide nucléique stables (SNALP)

En 2005, de nouvelles formulations lipidiques pour l'administration de siRNA ont été développées appelées « particules lipidiques d'acide nucléique stables » (SNALP) ayant des propriétés physico-chimiques distinctes des lipoplexes. Les SNALP sont généralement composés d'une formulation constituée de lipides ionisables, de cholestérol, de lipides auxiliaires (qui contribuent à l'absorption cellulaire et à la libération du siRNA de l'endosome), d'un lipide PEG protecteur (pour stabiliser les particules et empêcher la clairance systémique rapide) avec des rapports molaires définis. Le lipide protecteur peut également servir d'ancrage pour un ligand de ciblage. Contrairement aux liposomes, le cœur des SNALP est plus dense aux électrons et l'encapsulation des siRNA est proche de 100%. L'absence de charges des SNALP leur confère une certaine stabilité dans la circulation sanguine, avec une demi-vie plasmatique accrue et une toxicité réduite. D'autres ligands, y compris des anticorps, des fragments d'anticorps modifiés, des protéines, des peptides et de petites molécules peuvent être utilisés pour améliorer le ciblage *via* les interactions ligands-récepteurs, augmentant ainsi la possibilité d'atteindre différents sites cibles (Fonseca et al., 2018).

❖ **Les lipides ionisables**

La stratégie qui consiste à utiliser des lipides ionisables, sensibles au pH avec un pKa inférieur à 7, permet d'augmenter l'efficacité d'encapsulation, de réduire la toxicité dans le sang et d'améliorer la libération de siRNA dans la cellule. En effet, à des valeurs de pH faibles (pH ~

4), ces lipides ionisables sont chargés positivement, permettant l'interaction avec les siRNA chargés négativement. Cependant, à des valeurs de pH physiologiques, les lipides présentent une densité de charge positive minimale, permettant d'augmenter les temps de circulation et de réduire la toxicité. Une fois dans l'environnement acide des endosomes, le lipide ionisable sera chargé positivement favorisant ainsi la déstabilisation des membranes endosomales et la libération des siRNA dans le cytoplasme. Les lipides ionisables sont souvent des lipides à base d'amines, et constituent des composants centraux des SNALP. Le premier lipide cationique ionisable utilisé pour l'encapsulation des acides nucléiques était le 1,2-dioléoyl-3-diméthylammonium propane (DODAP). Depuis lors, plusieurs autres nouveaux lipides ionisables ont été synthétisés, dont le 1,2-dilinoéoxy-3-diméthylaminopropane (DLinDMA), l'heptatriaconta-6,9,28,31-tétraène-19-yl-4- (diméthylamino) butanoate, (DLin-MC3-DMA) ou encore le malate déshydrogénase. Les lipides ionisables se sont avérées être un succès significatif *in vivo* (Dong et al., 2019; Senel and Buyukkoroglu, 2019).

❖ Préparation des SNALP

La préparation des SNALP est plus compliquée que celle des lipoplexes, en effet, ils sont préparés en mélangeant des lipides avec une solution d'éthanol à 40% dans un tampon acide (pH = 4) pour former des liposomes chargés positivement, ayant une perméabilité membranaire élevée, permettant la liaison avec les siRNA anioniques. Cette étape est suivie par l'élimination des siRNA non complexés par dialyse contre un tampon neutre (pH 7,4) (Caillaud et al., 2020).

5.2.3.2.4 Les lipidoïdes

Les lipidoïdes sont des systèmes d'administration de siRNA développés par Alnylam Pharmaceuticals. Ils sont composés d'un noyau amine polaire entouré de courtes chaînes de carbone hydrophobes. Les lipidoïdes sont similaires aux systèmes de NPL cationiques ionisables en raison de l'utilisation de molécules lipidiques, de cholestérol et de lipides PEG. La différence la plus importante est la charge positive supplémentaire en raison du grand nombre d'amines protonisables liées aux diverses chaînes acyles. Le lien entre les différents groupes chimiques est facilement biodégradable par les estérases. Les lipidoïdes représentent une formulation prometteuse pour l'administration de siRNA, il a été décrit qu'ils induisaient une inhibition génique puissante et persistante, dans une variété de cibles cellulaires à la fois chez la souris, le rat mais aussi chez les primates non humains (Senel and Buyukkoroglu, 2019).

5.2.3.3 Les lipopolyplexes (LPP)

Le lipopolyplexe (LPP) est un nanocomplexe composé d'acide nucléique, de liposome cationique et de polycation (polymère ou peptide), formé par des interactions non covalentes. Ils ont été développés au départ en tant que vecteur non viral, pour l'administration d'ADN. Ils combinent les avantages des polyplexes et des lipoplexes, avec une stabilité importante, une cytotoxicité réduite, une efficacité de transfection génique extrêmement élevée grâce à la synergie du polycation et du lipide cationique. En fonction de leurs composants polycationiques, les LPP sont divisés en deux classes : les LPP à base de polymère cationique, et les LPP à base de peptide cationique (Chen et al., 2016; Rezaee et al., 2016).

5.2.3.3.1 Les LPP à base de polymère

En raison de leur importante capacité de condensation, divers types de polymères ont été étudiés dans des formulations LPP, telles que la PEI (ramifiée ou linéaire), la poly-L-lysine (PLL), le poly (ester bêta-aminé), la protamine, le chitosane, la poly-allylamine (PAA) et d'autres constructions. Comme discuté précédemment, la PEI présente une forte capacité de condensation de siRNA, mais sa mauvaise biocompatibilité limite son utilisation en clinique. Des lipides comme DOTAP, DOSPER, DOTMA ou encore la lipofectamine®2000 sont donc ajoutés pour diminuer sa cytotoxicité et améliorer son efficacité *in vivo* (Rezaee et al., 2016).

5.2.3.3.2 Les LPP à base de peptide

Les lipides cationiques possèdent une grande capacité de condensation des siRNA et une absorption cellulaire efficace avec une bonne biocompatibilité. Cependant, ils peuvent présenter une faible efficacité d'inhibition génique, en raison de la difficulté à échapper de l'endosome. Par conséquent, des peptides cationiques ont été ajoutés à ces lipoplexes pour améliorer leur transfection cellulaire et favoriser l'échappement endosomal grâce à des effets synergiques du peptide et du lipide. Ces peptides, biocompatibles et biodégradables, présentent une bonne efficacité de condensation des siRNA *via* des interactions électrostatiques. De plus, leurs méthodes de synthèse et de purification sont bien caractérisées (Chen et al., 2016; Rezaee et al., 2016).

Au fur et à mesure que la compréhension de la relation structure-fonction augmente, des systèmes d'administration de siRNA à base de lipides polyvalents avec des propriétés multifonctionnelles telles que la protection, le ciblage, la fusion membranaire, la libération de siRNA et une faible toxicité seront conçus pour surmonter les obstacles liés à l'administration de siRNA et améliorer les résultats thérapeutiques (Ho et al., 2016).

❖ Limites communes des nanoparticules de siRNA

Les nanoparticules lipidiques et polymériques représentent les formulations les plus couramment utilisées pour encapsuler les siRNA. Cependant, elles présentent des inconvénients dont certains ont déjà été décrits ci-dessus et qui peuvent être résumés en cinq points.

- i) Les interactions électrostatiques entre les polymères ou les lipides cationiques et les siRNA sont considérées comme faibles et peuvent être responsables d'une « libération en rafale » de siRNA après une administration *in vivo*, conduisant à l'apparition d'évènements indésirables, et d'une diminution de l'efficacité des siRNA.
- ii) La charge cationique des lipides et des polymères utilisés pour la formulation des nanoparticules peut entraîner des interactions non spécifiques avec les protéines sériques conduisant à une élimination rapide par le système réticulo-endothélial, et une diminution de l'efficacité des siRNA.
- iii) La PEGylation, comme discuté précédemment, peut entraîner la production d'anticorps anti-PEG conduisant à une élimination rapide des particules lors de la deuxième injection. Elle peut aussi induire des réactions d'hypersensibilité liées à l'activation du complément.
- iv) La fonctionnalisation de surface des nanoparticules, avec des ligands spécifiques, peut entraîner des effets hors cibles en raison de la liaison aux récepteurs exprimés à un niveau plus faible sur des cellules non ciblées.
- v) Enfin, il a été décrit que la charge cationique et la structure chimique de ces matériaux peuvent entraîner une cytotoxicité dose-dépendante, non seulement dans les fluides biologiques et le cytoplasme, mais aussi dans le noyau avec une altération de l'expression des gènes conduisant à une perturbation des processus cellulaires, c'est ce qu'on appelle la toxicogénomique.

6. Les siRNA en essais cliniques et sur le marché

6.1 Les essais cliniques utilisant des siRNA

Depuis la découverte révolutionnaire de l'ARN interférence en 1998, un progrès remarquable a été accompli dans le développement de systèmes d'administration pour l'application thérapeutique des siRNA. Certaines de ces formulations ont passé avec succès toutes les étapes de développement préclinique, prouvant qu'elles ont été jugées suffisamment sûres et suffisamment efficaces pour être administrées aux patients. Ainsi, les essais cliniques de candidat-médicament à base de siRNA sont en augmentation constante et plus de 80 essais ont été lancés depuis 2004 (Sixfold Bioscience, 2020), regroupant un champ très large de pathologies, comme les maladies oculaires, la cancérologie, les maladies virales ou encore les maladies hépatiques. Un certain nombre de ces siRNA-médicament ont atteint la phase III du développement clinique (Figure 47), et deux d'entre eux ont récemment été approuvés par la FDA et l'Agence européenne de médecine (EMA) pour le traitement de deux pathologies héréditaires, ce qui prouve l'avenir thérapeutique prometteur des siRNA (voir siRNA commercialisés).

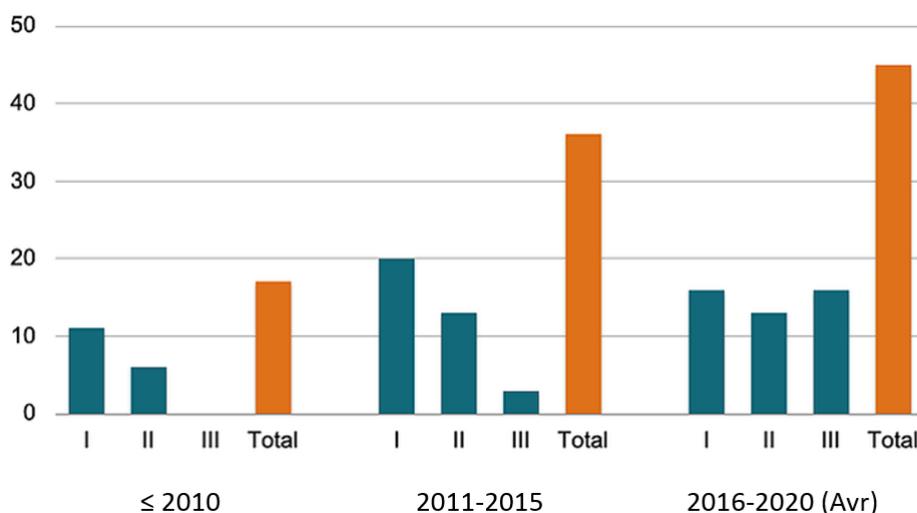


Figure 47 : Le nombre d'essais cliniques à base de siRNA par phase, lancés entre 2004-2020.
Graphe issu de (Sixfold Bioscience, 2020).

Le premier candidat-médicament à base de siRNA qui est entré en essai clinique est le Bévásiranib, un siRNA synthétique testé pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et l'œdème maculaire diabétique. Ce siRNA cible l'ARNm codant le V-EGF. Le Bévásiranib est administré directement au tissu oculaire par injection intra-vitréenne, pour inhiber la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la rétine des patients. Les résultats attendus ont été obtenus dans les essais de phase I et II (NCT00722384,

NCT00259753). Cependant, l'étude de phase III a été interrompue pour sa faible efficacité à réduire la perte de la vision (NCT00499590) (Dejneka et al., 2008; Zhou et al., 2019).

Depuis lors, des thérapies basées sur l'ARNi ont été développées pour d'autres maladies oculaires, telles que la rétinopathie diabétique, la rétinite pigmentaire, la néovascularisation cornéenne, les maladies oculaires fibrotiques ou le glaucome (Guzman-Aranguez et al., 2013)

L'œil est considéré comme une bonne cible pour la thérapie à base d'ARNi en raison de la possibilité d'administration locale des siRNA, en topique ou par injection intra-vitréenne, diminuant ainsi les effets secondaires associés à la distribution systémique. Des siRNA nus ou conjugués ont été testés sur des modèles animaux expérimentaux, par administration oculaire, et des essais cliniques ont été menés avec certains d'entre eux. Ainsi, 75% des siRNA non vectorisés, qui ont été évalués en essai clinique entre 2004 et 2020, avaient pour cible l'œil (Figure 48) (Sixfold Bioscience, 2020).

Plusieurs siRNA sont également développés pour cibler le foie, notamment pour le traitement de l'hépatite B. Cette infection hépatique grave, causée par le virus de l'hépatite B (VHB), ne peut pas être traitée de façon permanente avec les médicaments antiviraux actuellement disponibles. Par conséquent, la thérapie à base de siRNA présente une stratégie prometteuse en bloquant l'expression de tous les antigènes du virus, ainsi que la transcription de l'ARN du VHB en ADN (Hu et al., 2019).

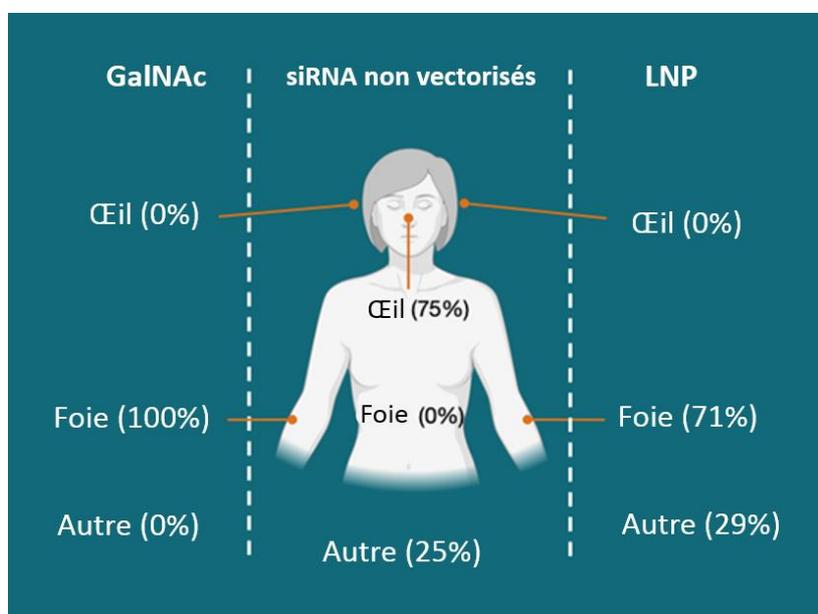


Figure 48 : Organes cibles des trois principaux systèmes d'administration des siRNA thérapeutiques, par pourcentage d'essais cliniques au cours de la période 2004-2020.
Image issue de (Sixfold Bioscience, 2020).

Le foie constitue une cible privilégiée pour les thérapies à base de siRNA en raison de l'efficacité des vecteurs ciblant les cellules hépatiques, notamment les nanoparticules lipidiques et les conjugués siRNA-GalNAc. En effet, les formulations lipidiques des siRNA s'accumulent préférentiellement dans le foie, en raison de leur capacité à se lier à l'ApoE, de manière non spécifique, et à déclencher une absorption de type LDL dans les hépatocytes (Fonseca et al., 2018). Ces nanoparticules représentent le deuxième vecteur d'administration le plus courant (Figure 49). Elles ont été utilisées dans 19% des essais cliniques à base de siRNA lancés entre 2004 et 2020, dont 71% ciblant le foie (Figure 48) (Sixfold Bioscience, 2020).

Les candidats médicaments utilisant des bioconjugués GalNAc-siRNA représentent 45% des essais cliniques de siRNA développés entre 2004 et 2020, et un tiers de ceux actuellement en cours (Saw and Song, 2020; Sixfold Bioscience, 2020). Cette utilisation de conjugués GalNAc-siRNA dans les essais cliniques croît au rythme le plus rapide comparé aux autres systèmes d'administration (Figure 49). Ainsi en 2019, le nombre d'essais cliniques utilisant la technologie GalNAc était de 23, tandis que des systèmes d'administration alternatifs ont été utilisés dans 1 à 4 essais cliniques (Sixfold Bioscience, 2020). En effet, en raison de l'innocuité des conjugués GalNAc-siRNA, et de leur longue durée d'action pour le traitement des maladies hépatiques mais aussi de celles impliquant des gènes exprimés par le foie, Alnylam a renoncé aux systèmes d'administration lipidiques et s'est tourné vers ces bioconjugués. D'autres sociétés pharmaceutiques travaillant sur les oligonucléotides comme Arrowhead, Dicerna, ou Silence ont également développé plusieurs candidats médicaments, également des bioconjugués GalNAc-siRNA, actuellement en cours d'essais cliniques (Tableau 9, page 157).

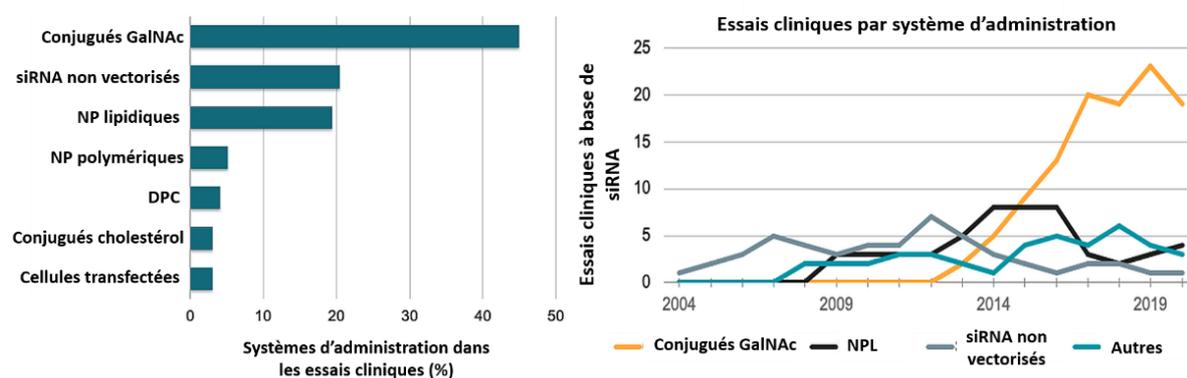


Figure 49 : Systèmes d'administration de siRNA dans les essais cliniques.

Les systèmes d'administration thérapeutique de siRNA utilisés dans les essais cliniques, pour la période 2004-2020 (A). Nombre d'essais cliniques à base de siRNA par système d'administration actifs chaque année, au cours de la période 2004-2020 (B). (Abréviations : DPC, dynamic polyconjugate ; NPL, nanoparticules lipidiques ; NP, nanoparticules). Image adaptée de (Sixfold Bioscience, 2020).

Bien que la majorité des candidats-médicaments actuellement en cours de développement clinique ciblent le foie, il existe un grand potentiel pour des approches ciblant d'autres tissus que le foie. En effet, Alnylam tente maintenant de développer des systèmes d'administration de type conjugués ligand-siRNA pour cibler le système nerveux central et les tissus oculaires (Hu et al., 2019). Bien que les détails n'aient pas été publiés, Alnylam a annoncé le programme d'ALN-APP, un siRNA ciblant la protéine précurseur amyloïde (APP) pour le traitement de l'angiopathie amyloïde cérébrale héréditaire (hCAA) et de la maladie d'Alzheimer familiale à début précoce (EOFAD).

En parallèle, Quark Pharmaceuticals a développé le QPI-1002, un siRNA conçu pour inhiber l'expression de la protéine pro-apoptotique p53, pour prévenir les lésions rénales aiguës chez les patients à risque, après une chirurgie cardiaque. Les résultats des phases I et II ont démontré que le QPI-1002 était bien toléré chez les patients sans aucune toxicité (Demirjian et al., 2017), et un essai de phase III est actuellement en cours (NCT03510897).

À l'avenir, développer des systèmes d'administration ciblant des tissus extra-hépatiques constituera la prochaine frontière à franchir pour un développement plus large de la thérapie d'ARN interférence. Ainsi, l'application thérapeutique des siRNA pourrait concerner diverses pathologies, telles que les maladies pulmonaires, cardiaques, ou encore le système nerveux central, en particulier pour les cibles qui sont actuellement inaccessibles aux approches traditionnelles à petites molécules ou anticorps. En plus des systèmes de distribution, des voies d'administration spécifiques telles que l'injection intra-vitréenne, l'administration intra-trachéale ou encore l'injection céphalo-rachidienne pourront être utilisées pour une administration localisée des molécules de siRNA, permettant de contourner les limitations de la voie systémique.

SiRNA	Sponsor	Indication	Voie d'administration	Système d'administration	Phase	Statut	NCT
Fitusiran (ALN-AT3SC)	Alnylam Pharmaceuticals (Sanofi)	Hémophilie A, B	SC	GalNAc - siRNA	III	Recrutement	NCT03417245
Inclisiran (ALN-PCSSC)	Alnylam Pharmaceuticals (the Medicines Company)	Maladies Cardiovasculaires Athérosclérotiques Hypercholestérolémie	SC	GalNAc - siRNA	II	Actif, ne recrute pas	NCT03060577
VIR-2218	Alnylam Pharmaceuticals (Vir Biotechnologies)	Hépatite B chronique	SC	GalNAc - siRNA	I/II	Recrutement	NCT03672188
Lumasiran (A16ALN-GO1)	Alnylam Pharmaceuticals	Hyperoxalurie primaire Type 1 (PH1)	SC	GalNAc - siRNA	III	Actif, ne recrute pas	NCT03681184
Vutrisiran (ALN-TTRSC02)	Alnylam Pharmaceuticals	Amylose à transthyréline Hériditaire	SC	GalNAc - siRNA	III	Actif, ne recrute pas	NCT03759379
ARO-AAT	Arrowhead Pharmaceuticals	Déficit en α -1 antitrypsine	SC	GalNAc - siRNA	I	Actif, ne recrute pas	NCT03362242
ARO-HBV	Arrowhead Pharmaceuticals	Hépatite B	SC	GalNAc - siRNA	I/II	Actif, ne recrute pas	NCT03365947
KRAS G12D siRNA	M.D. Anderson Cancer Center	Cancer pancréatique : KRAS G12D	IV	mesenchymal-stromal-cell-derived exosomes with KRAS G12D siRNA	I	Actif, ne recrute pas	NCT03608631
EphA2-targeting DOPC-encapsulated siRNA	M.D. Anderson Cancer Center	Tumeur solide maligne avancée	IV	EphA2-targeting DOPC-encapsulated siRNA	I	Recrutement	NCT01591356
QPI-1002	Quark Pharmaceuticals	Chirurgie cardiaque	IV	NA	III	Recrutement	NCT03510897
siG12D-LODER	Silenseed Ltd	Adénocarcinome ductal pancréatique, cancer pancréatique	Intra-tumorale	polymer matrix siRNA	II	Recrutement	NCT01676259
ALN-AAT02	Alnylam Pharmaceuticals	Déficit en α -1 antitrypsine Maladie hépatique	SC	GalNAc - siRNA	I/II	Actif, ne recrute pas	NCT03767829
AMG 890	Amgen	Maladies cardio-vasculaires	SC	GalNAc - siRNA	I	Actif, ne recrute pas	NCT03626662
ARO-ANG3	Arrowhead Pharmaceuticals	Hypercholestérolémie Hypertriglycéridémie	SC	GalNAc - siRNA	I	Recrutement	NCT03747224
ARO-APOC3	Arrowhead Pharmaceuticals	Hypertriglycéridémie	SC	GalNAc - siRNA	I	Recrutement	NCT03783377
DCR-HBVS	Dicerna Pharmaceuticals	Hépatite B	SC	GalNAc - siRNA	I	Recrutement	NCT03772249
ND-L02-s0201	Nitto Denko Corporation	Fibrose pulmonaire idiopathique	IV	NPL, vitamine A	II	Recrutement	NCT03538301

Tableau 9 : Les principaux essais cliniques en cours de candidats-médicaments à base de siRNA.

Abréviations : DOPC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine; DC, cellules dendritiques ; IV, injection intraveineuse ; NPL, nanoparticule lipidique; NA, Not available ; PD-1, *programmed cell death 1*; SC, injection sous-cutanée. Adapté de (Hu et al., 2019; Saw and Song, 2020; Setten et al., 2019; Zhou et al., 2019).

6.2 Les siRNA commercialisés

6.2.1 Patisiran

En août 2018, 20 ans après la découverte de l'ARN interférence, le Patisiran (Onpatro®), ou ALN-TTR02, le premier médicament à base de siRNA, a été approuvé par la FDA pour le traitement de l'amylose transthyréine héréditaire (HATTR) (Saw and Song, 2020).

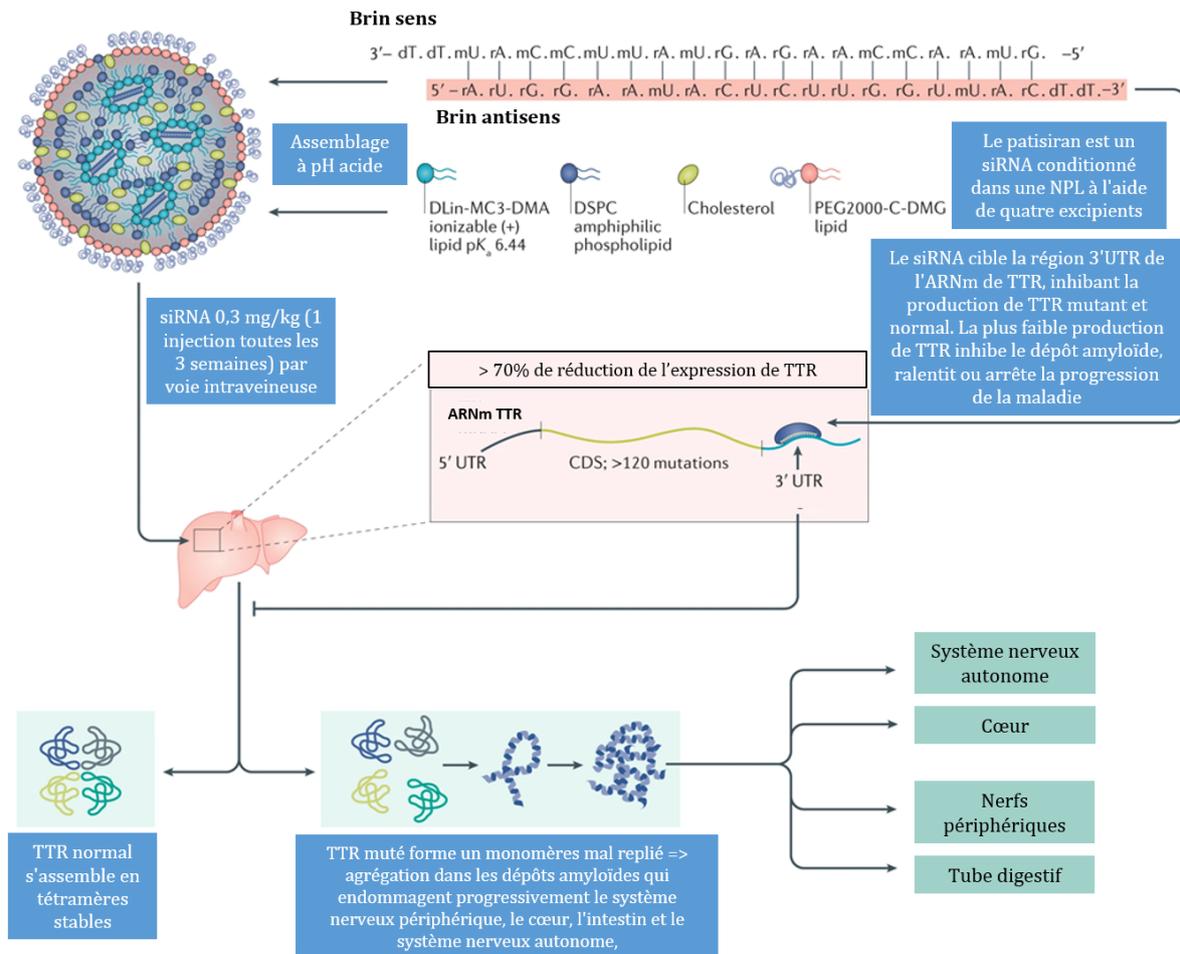


Figure 50 : Le mécanisme thérapeutique du patisiran.

Le patisiran est constitué d'un siRNA en complexe avec des excipients lipidiques. Les composants sont assemblés à pH acide dans des NPL et injectés en IV une fois toutes les 3 semaines à des doses de 0,3 mg/kg. Le siRNA cible la région 3' (UTR) du gène TTR, qui code la transthyréine, pour inhiber tous les ARNm possibles, c'est-à-dire présentant ou non des mutations dans la région codante. Cela entraîne des réductions soutenues > 70% des protéines TTR circulantes, arrêtant efficacement le dépôt d'amyloïdes TTR. Pour le siRNA, «m» = bases 2'-O-méthyl modifiées, «r» = ARN et «d» = ADN. Image adaptée de (Setten et al., 2019).

L'HATTR, également appelée polyneuropathie amyloïde familiale à transthyréine (TTR-FAP) ou cardiomyopathie amyloïde familiale (TTR-FAC), est une maladie rare, évolutive et mortelle. A l'heure actuelle, il existe environ 3000 patients diagnostiqués atteints de HATTR aux États-Unis, et environ 50 000 cas dans le monde. Les patients souffrent principalement de neuropathie progressive et de cardiomyopathie, avec une survie médiane inférieure à 15 ans. Cette maladie est caractérisée par le dépôt anormal de la protéine de transthyréine amyloïde

(TTR) mal repliée, dans divers organes y compris le cœur, les reins et les nerfs périphériques. La TTR est une protéine circulante synthétisée par le foie, son rôle est de transporter principalement le rétinol, et en plus faible proportion, l'hormone thyroïdienne (thyroxine). Le gène codant la TTR peut être muté, entraînant un mauvais repliement, et une agrégation des protéines, formant des fibrilles amyloïdes, qui se déposent dans les tissus. Une des stratégies est donc d'inhiber l'expression du gène TTR par un siRNA spécifique (Saw and Song, 2020).

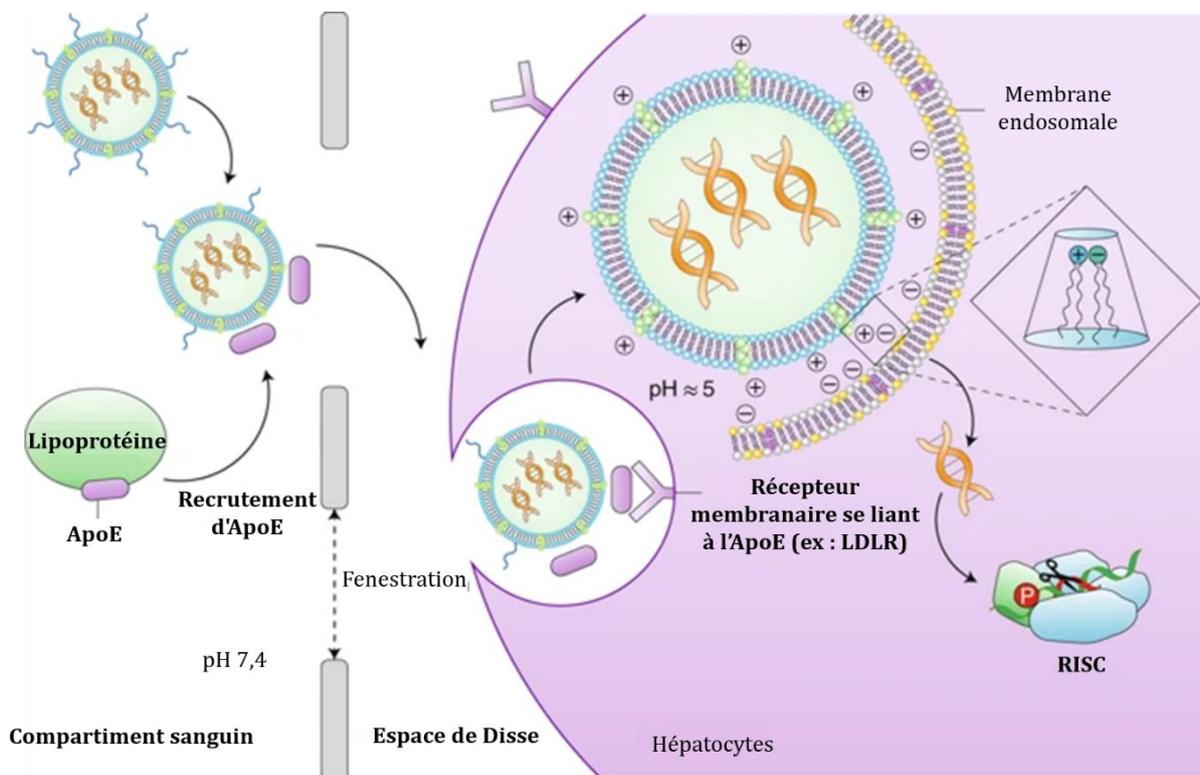


Figure 51 : Modèle de distribution médiateur par des NPL de siRNA aux hépatocytes *in vivo*, utilisé pour l'administration de patisiran.

Les étapes clés comprennent la dissociation des lipides-PEG de la surface des particules, le recrutement d'ApoE endogène à la surface des nanoparticules, le passage *via* l'endothélium fenêtré et la liaison aux récepteurs de LDL et autres récepteurs de liaison d'ApoE sur les hépatocytes, l'internalisation des vecteurs *via* l'endocytose, protonation du lipide ionisable en raison du faible pH de l'endosome, interaction du lipide ionisable protoné avec des lipides endogènes chargés négativement, ce qui entraîne la déstabilisation de la membrane endosomale et la libération du siRNA dans le cytoplasme, où il peut interagir avec la machinerie d'ARNi. Image adaptée de (Akinc et al., 2019).

Des nanoparticules lipidiques de type SNALP ont été utilisées pour la formulation de ce siRNA. Ce dernier a été modifié avec des résidus de sucre O-Méthylé et quatre résidus 2'-désoxy thymidine (Hu et al., 2019). Les composants lipidiques de cette formulation comprennent un lipide aminé ionisable (Dlin-MC3-DMA, pKa = 6,44), un lipide PEGylé (le lipide PEG2000-C-DMG), un lipide polaire (DSPC) et le cholestérol (Figure 50). Dans la circulation sanguine, les lipides PEGylés sont éliminés et remplacés par des protéines sériques, telles que l'Apo E, induisant l'internalisation par les hépatocytes. L'endocytose médiateur par les récepteurs conduit

à l'acidification des endosomes, induisant une ré-ionisation du principal lipide ionisable et la libération du siRNA dans le cytoplasme (Figure 51) (Hu et al., 2019).

Les résultats de l'essai clinique de phase 3, APPOLO (NCT01960348), réalisé par Alnylam Pharmaceuticals, ont démontré une inhibition moyenne de 87,8% de l'expression de la TTR sérique par le Patisiran, accompagnée d'une amélioration de tous les critères d'évaluation primaires et secondaires. Une réduction de 50% de l'hospitalisation et de la mortalité toutes causes confondues ainsi qu'une amélioration considérable des multiples manifestations cliniques de la maladie ont également été constatées. Le taux de progression de la maladie a également été remarquablement ralenti. La fréquence et la gravité des événements indésirables étaient similaires chez les patients recevant du patisiran et chez ceux recevant un placebo. Six ans après le début des études cliniques, ce candidat-médicament a été approuvé par l'EMA et la FDA. Cependant le traitement reste coûteux, car le médicament est actuellement au prix de 450000\$ par an, ce qui pourrait être un fardeau énorme pour les patients surtout qu'un traitement répétitif pourrait être nécessaire en raison de l'effet transitoire du siRNA (Hu et al., 2019; Saw and Song, 2020)

6.2.2 Givosiran

En Novembre 2019, un deuxième médicament à base de siRNA, administré en sous-cutané, le givosiran (Givlaari®), a été approuvé par la FDA (suivi en janvier 2020 par l'EMA) pour le traitement des adultes atteints de la porphyrie hépatique aiguë (AHP).

La porphyrie hépatique aiguë est une pathologie hépatique héréditaire rare, qui entraîne l'accumulation des intermédiaires neurotoxiques, l'acide aminolévulinique (ALA) et le porphobilinogène (PBG) pendant le cycle de production de l'hème (le site de liaison de l'oxygène de l'hémoglobine) dans les cellules hépatiques. Les patients atteints de cette maladie présentent des douleurs abdominales sévères, des nausées, des vomissements et de la constipation (Al Shaer et al., 2020).

Le givosiran est un siRNA dirigé contre l'ARNm de l'aminolévulinate synthase 1 (ALAS1), conjugué de manière covalente à un ligand, le GalNAc, lié à l'extrémité 3' du brin sens, permettant une distribution spécifique du siRNA aux hépatocytes (Scott, 2020). Les 2'-OH du ribose dans certains monomères sont méthylés (formant le 2'-O-méthyl-ribonucléoside), tandis que dans d'autres, ils sont substitués par l'atome de fluor hautement électro-négatif (2'-F-ribonucléoside), afin d'améliorer la stabilité des siRNA contre les nucléases (Figure 52 et Figure 53). Dans les cellules, le siRNA inhibe l'expression de l'ALAS1, arrêtant ainsi la production d'ALA et empêchant, par conséquent, l'accumulation des intermédiaires toxiques (Al Shaer et al., 2020)

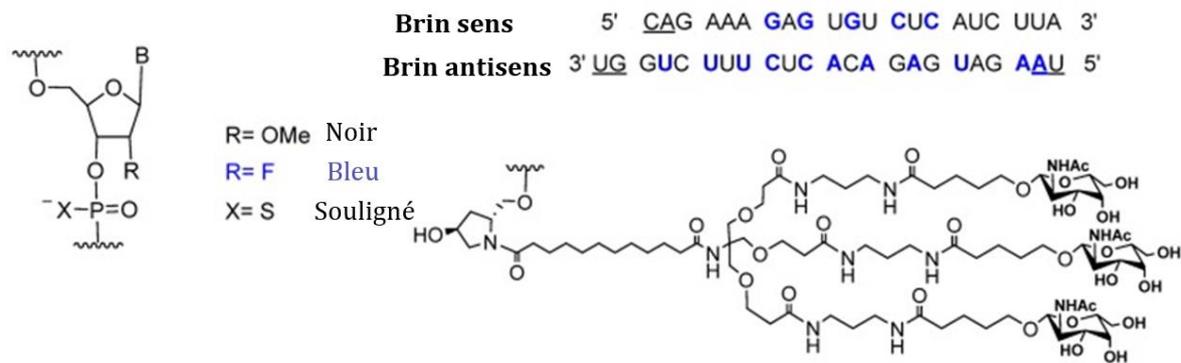


Figure 52 : Structure chimique du Givosiran (Givlaari).

Image adaptée de (Al Shaer et al., 2020).

Les résultats de l'essai multinational ENVISION de phase III, réalisé par Alnylam Pharmaceuticals, ont démontré une régulation négative de l'ARNm d'ALAS1, et une inhibition de l'accumulation de PBG et d'ALA neurotoxique, avec une bonne tolérance chez les patients (Scott, 2020). Cependant, des contrôles réguliers de la fonction hépatique et rénale sont fortement recommandés (Al Shaer et al., 2020).

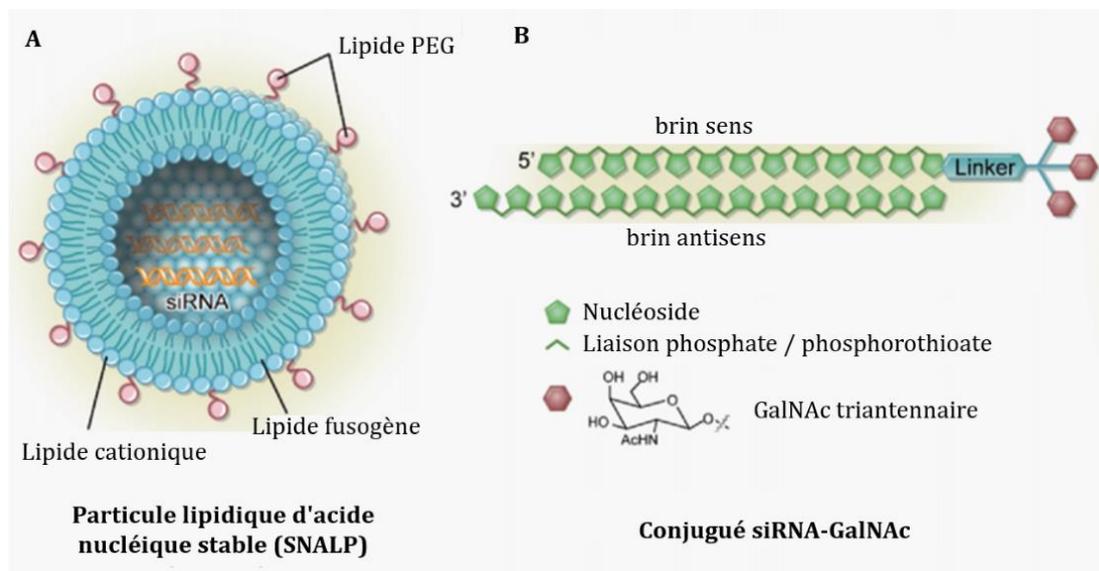


Figure 53 : Système d'administration de siRNA actuellement approuvés.

A) Une SNALP développée par Alnylam, qui est le vecteur d'administration de Patisiran (Onpattro). B) siRNA conjugué au GalNAc pour former un conjugué siRNA- GalNAc pour un ciblage spécifique des hépatocytes par le givosiran. Image adaptée de (Saw and Song, 2020).

Très rapidement après sa découverte en 1998, l'ARNi a été considérée comme un mécanisme thérapeutique puissant en raison de la spécificité et de l'efficacité élevées du siRNA à faibles doses, pour l'extinction de l'expression d'un gène cible en dégradant son ARNm. Les différentes barrières extracellulaires et intracellulaires de l'organisme ainsi que les caractéristiques physico-chimiques des siRNA constituant un obstacle majeur pour leur administration aux cellules cibles, plusieurs systèmes de vectorisation allant de la conjugaison à une molécule jusqu'à la vectorisation dans des nanoparticules lipidiques ou polymériques ont été développés. Ces vecteurs ont permis le développement des deux premiers médicaments à base de siRNA, 20 ans après leur découverte. Plusieurs essais cliniques utilisant des siRNA sont actuellement en cours pour le traitement de diverses pathologies acquises ou héréditaires, un seul essai concerne la fibrose hépatique. Cependant, plusieurs stratégies anti-fibrotiques à base de siRNA sont étudiées à des stades précliniques et les principales approches seront décrites dans le chapitre suivant.

Chapitre IV : Les stratégies thérapeutiques à base d'ARN interférents

1. Stratégies pour une administration ciblée des agents thérapeutiques aux HSCs

De nombreux agents thérapeutiques, y compris des petites molécules, des protéines, des siRNA, des microRNA et des plasmides ont été étudiés pour le traitement de la fibrose hépatique. Cependant, ces agents thérapeutiques ne peuvent pas atteindre facilement les HSCs dans les foies fibrotiques en raison du faible nombre de ces cellules, de l'accumulation de la MEC, de la fermeture des fenestrations de l'endothélium et de la réduction de l'espace de Disse (Garcia-Bañuelos et al., 2002; Varin and Huet, 1985). Le développement de stratégies pour cibler les HSCs est donc crucial pour le traitement de la fibrose hépatique.

Un certain nombre de stratégies de ciblage sont en cours d'évaluation, *in vivo* et *in vitro*, pour leur capacité à administrer des agents thérapeutiques sélectivement aux myofibroblastes hépatiques, et plus précisément, aux HSCs activées. Celles-ci comprennent la modification des molécules thérapeutiques, ou de leurs vecteurs, par le mannose-6-phosphate, pour leur absorption *via* le récepteur de facteur de croissance analogue à l'insuline II (IGF-IIR), ou par des peptides qui reconnaissent les récepteurs du collagène de type VI ou encore des dérivés du facteur de croissance plaquettaire (PDGF) (Figure 54). Les principaux récepteurs, leurs ligands ainsi que les systèmes d'administration utilisés pour un ciblage des HSCs sont résumés dans le Tableau 10 et seront détaillés ci-dessous (Chen et al., 2019).

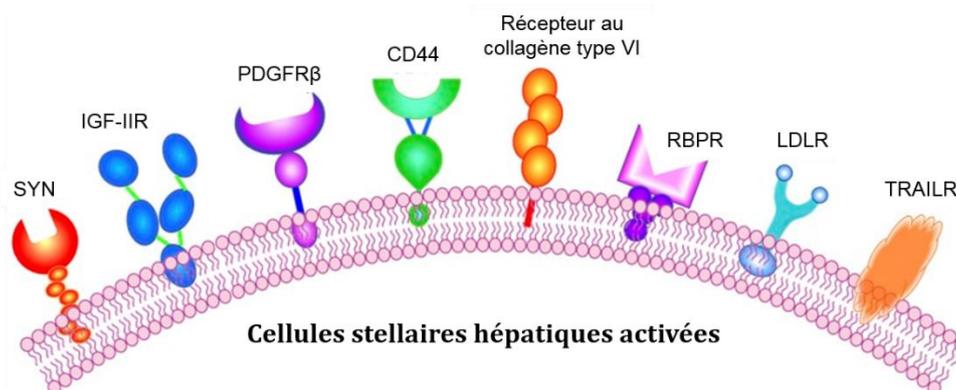


Figure 54 : Récepteurs surexprimés dans les HSCs activées.
Image adaptée de (Chen et al., 2019).

Marqueur spécifique des HSCs	Ligand utilisé	Système d'administration	Agent thérapeutique	Référence	
Récepteur au collagène de type VI	Peptide RGD cyclique (C*GRGDSPC*)	Liposome	IFN- α 1b	(Du et al., 2007)	
		Copolymères	Oxymatine	(Yang et al., 2014a)	
		Conjugué	HSA	(Beljaars et al., 2000)	
Récepteur aux RBPs	Vitamine A	Liposome	siRNA	(Sato et al., 2008b)	
		Nanoparticule polymérique (PEI)	Oligonucléotide	(Zhang et al., 2015)	
PDGFR- β	Peptide cyclique (C*SRNLIDC*)	Conjugué	HSA	(Beljaars et al., 2003)	
		Liposome	IFN- γ	(Li et al., 2012)	
Synaptophysine	scAb	Conjugué	Tributyltin	(Douglass et al., 2008b)	
	M6P	Conjugué	Y27632	(Beuge et al., 2011)	
IGF-IIR	Peptide	Nanocomplexe Biotine-PEG-NeutrAvidin	siRNA	(Zhao et al., 2018)	
		Aptamère	Conjugué	siRNA	(Chen et al., 2017b)
		Nanoparticule Polymérique (PLA)	Curcumine	(Chen et al., 2017a).	
CD44	Acide hyaluronique	Micelle	Losartan	(Thomas et al., 2015)	
		Nanocomplexe de PEI	siRNA	(Park et al., 2011)	
		Conjugué	TRAIL	(Yang et al., 2015)	

Tableau 10 : Marqueurs spécifiques des HSCs pour une administration ciblée d'agents anti-fibrotiques.
Adapté de (Chen et al., 2019).

1.1 Récepteur au collagène de type VI

Le récepteur au collagène de type VI est surexprimé par les HSCs activées et a été utilisé pour administrer des agents thérapeutiques aux HSCs.

Un peptide cyclique RGD, ligand de ce récepteur, a été conjugué à l'albumine sérique humaine (HSA) et a induit une accumulation préférentielle dans le foie des rats BDL avec un internalisation importante dans les HSCs activées (Beljaars et al., 2000). Ce peptide a également été conjugué à des copolymères biodégradables encapsulant l'oxymatine, un alcaloïde possédant un effet anti-fibrotique. Le traitement des HSCs primaires en culture par l'oxymatine ciblée a permis une augmentation de l'internalisation cellulaire en comparaison à l'oxymatine encapsulée dans des copolymères non conjugués ainsi qu'une inhibition de la prolifération des HSCs et une réduction significative de l'expression du collagène 1 α 1 et du α -SMA. L'administration de l'oxymatine ciblée à des rats BDL a induit un effet anti-fibrotique important, par diminution des dépôts de tissu fibreux dans le foie des rats traités (Yang et al., 2014a). De même, l'utilisation de liposomes conjugués au RGD, pour l'administration d'oxymatine dans un modèle murin de fibrose induite par le CCl₄, a permis d'améliorer l'efficacité de ciblage des HSCs *in vivo*, d'induire leur apoptose et d'atténuer la fibrose

hépatique (Chai et al., 2012). Enfin, le peptide RGD a également été conjugué à des liposomes stériquement stables (SSL) et a permis une accumulation des liposomes dans les HSCs de rats BDL, 10 fois plus élevée comparée aux liposomes SSL non modifiés. Le traitement des rats BDL par les liposomes SSL-RGD contenant l'interféron $\alpha 1b$ (IFN- $\alpha 1b$) a induit un effet anti-fibrotique important comparé au traitement par les particules SSL-IFN- $\alpha 1b$ non conjuguées (Du et al., 2007).

1.2 Récepteur aux RBPs (RBPR)

Les HSCs possèdent une capacité importante d'absorption de la vitamine A, *via* les récepteurs aux protéines de liaison au rétinol (RBPs). Il a été décrit que la vitamine A est captée de manière aussi efficace par les HSCs activées que par les HSCs quiescentes (Sato et al., 2008a). La vitamine A et les RBPs ont donc été utilisées comme ligands pour une administration spécifique d'agents thérapeutiques aux HSCs.

La vitamine A conjuguée à des nanoparticules lipidiques fluorescentes a permis une accumulation sélective dans les HSCs exprimant le α -SMA par rapport aux hépatocytes, dans un modèle murin de fibrose induite par le CCl_4 (Toriyabe et al., 2017). La vitamine A a également été conjuguée à des nanoparticules polymériques incorporant des molécules donneuses de NO (composé de S-nitroso-glutathion). Une internalisation importante de ces nanoparticules conjuguées a été observée dans des HSCs primaires de rat et dans les cellules LX-2, accompagnée d'une inhibition de l'expression du collagène de type I et du α -SMA. Ces nanoparticules conjuguées ont été ensuite PEGylées afin d'augmenter leur demi-vie sanguine, puis injectées en IV à des rats BDL. L'étude de biodistribution a montré une accumulation importante de ces nanoparticules dans les foies fibrotiques (Duong et al., 2015). Une étude similaire, utilisant des nanoparticules lipidiques incorporant le rétinol et encapsulant la silibinine, une molécule ayant un effet anti-hépatotoxique, a induit une accumulation hépatique importante des nanoparticules, contrairement aux formulations dépourvues de rétinol (Pan et al., 2016). Le rétinol a également été conjugué à des nanoparticules polymériques à base de PEI (RcP, *retinol-conjugated polyethylenimine*) et encapsulant un oligonucléotide ayant un effet anti-fibrotique. Des expériences *in vitro* ont montré que les RcP sont captées par les HSC-T6 *via* les récepteurs RBPR, avec une efficacité d'internalisation importante et présentent une liaison sélective aux RBPs en présence du sérum. L'injection intraveineuse des RcP, à des souris atteintes de fibrose hépatique, a induit une forte accumulation hépatique de ces nanoparticules avec une internalisation importante dans les cellules non parenchymateuses, en particulier les HSCs exprimant le α -SMA (Zhang et al., 2015).

Les RBPs ont également été utilisées pour un ciblage spécifique des HSCs. La fusion de RBP au domaine III de l'albumine (RBP-R-III) induit une internalisation importante dans les HSCs

primaires de rat en culture, contrairement à l'albumine seule (Park et al., 2012). L'administration de RBP-R-III à de deux modèles murins de fibrose, CCl₄ et BDL, a induit une distribution préférentielle dans les HSCs, bien qu'un signal faible et non spécifique ait également été détecté dans les cellules parenchymateuses (Lee et al., 2015a).

1.3 Récepteur à l'Insulin-like Growth Factor II / mannose-6-phosphate (IGF-IIR/M6P)

Le récepteur à l'*Insulin-like Growth Factor II* (IGF-IIR) est impliqué dans l'internalisation de deux classes non liées de ligands, les hydrolases acides contenant du mannose 6-phosphate (M6P) et le facteur de croissance IGF-II. Il a été décrit que l'internalisation *via* l'IGF-IIR de la β -glucuronidase, un homo-tétramère portant plusieurs fragments de M6P, est 3 à 4 fois plus rapide que celle de l'IGF-II (York et al., 1999). Comme l'IGF-IIR n'est pas lié à une activité tyrosine kinase, ni à la prolifération, il est considéré comme un récepteur prometteur pour une administration ciblée d'agents thérapeutiques, sans induire la prolifération des HSCs.

Le M6P a été conjugué à l'albumine sérique humaine (HSA) pour l'administration de la doxorubicine (DOX), une molécule ayant un effet anti-prolifératif, aux HSCs. Le complexe ainsi formé M6P-HSA-DOX, injecté à des rats BDL, se localise préférentiellement dans le foie (environ 50% de la dose injectée), avec une accumulation importante dans les HSCs (Greupink et al., 2006). De même, la conjugaison de M6P et de Y27632, un inhibiteur de la Rho kinase ayant des propriétés anti-fibrotiques, à l'HSA induit une distribution majoritaire dans les HSCs des souris atteintes de fibrose induite par le CCl₄, accompagnée d'une réduction de l'expression du collagène dans le foie (Beuge et al., 2011). Le M6P a également été conjugué à l'interleukine-10 (IL-10), une cytokine anti-inflammatoire ayant une action anti-fibrotique. Chez des rats atteints de fibrose hépatique induite par le CCl₄, le M6P-IL-10 s'accumule dans le foie tandis que l'IL-10 seule s'accumule dans les reins. Cependant, en raison de sa charge négative, le M6P a présenté une liaison aux récepteurs *scavengers* de type A, présents à la surface des cellules de Kupffer et des cellules endothéliales sinusoidales, en plus de sa liaison au récepteur IGF-IIR des HSCs (Rachmawati et al., 2007). Il a également été démontré que l'utilisation de plusieurs fragments de M6P permet d'augmenter l'absorption des particules conjuguées par les HSCs. En effet, l'albumine sérique bovine (BSA) a été conjuguée à plusieurs fragments de M6P, pour transporter un oligonucléotide (*triplex forming oligonucleotide* : TFO) spécifique du collagène de type 1, vers les HSCs activées. En augmentant le nombre de M6P par BSA de 14 à 27, l'accumulation hépatique de M6P-BSA-TFO est passée de 55% à 68%, suite à l'administration systémique des nanoparticules à des rats atteints de fibrose induite par DMN. Après administration de (M6P)₂₀-BSA-TFO et

isolement des cellules hépatiques, 42% des nanoparticules étaient internalisées par les HSCs de foies sains, contre 82% dans les HSCs de foies fibrotiques (Ye et al., 2006).

Le peptide 431 a été identifié comme étant un ligand de l'IGF-IIIR. La dimérisation de ce peptide augmente son affinité de liaison aux cellules LX-2 d'environ 9 fois (Chen et al., 2015). Les études utilisant ce peptide seront décrites plus loin (voir 2.1 Collagène et protéines associées).

1.4 Récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes β (PDGFR- β)

L'expression des récepteurs au PDGF est faible dans un foie sain, mais augmente de manière significative dans les HSCs activées lors d'une lésion hépatique (Kocabayoglu et al., 2015).

Un peptide cyclique CSRNLIDC a été développé, en se basant sur la séquence en acides aminés du PDGF impliquée dans la liaison au récepteur. Des études *in vitro* ont montré que la conjugaison de ce peptide à l'HSA induit une liaison au récepteur PDGFR- β à la fois sur des fibroblastes NIH/3T3 et des HSCs activées. Une étude de biodistribution de ce conjugué a montré une accumulation importante dans le foie des rats BDL, contrairement à l'albumine non conjuguée, avec une localisation majoritaire dans les HSCs activées (Beljaars et al., 2003). L'administration des complexes peptide-HSA-PEG-IFN- γ contenant l'albumine PEGylée, conjuguée au peptide CSRNLIDC et à l'IFN- γ à des souris atteintes de fibrose induite par le CCl₄ induit également une accumulation rapide des complexes dans les HSCs et un effet anti-fibrotique important, contrairement à l'IFN- γ non conjugué, sans induire d'effets secondaires liés à l'IFN- γ (Bansal et al., 2011a, 2011b). Ce peptide cyclique a également été utilisé pour transporter des liposomes encapsulant l'IFN- γ aux HSCs et a permis une accumulation principalement hépatique de l'IFN- γ , chez des rats sains. Une localisation dans les HSCs activées a été mise en évidence, après administration de liposomes conjugués, à des rats atteints de fibrose hépatique induite par la thioacétamide. Une augmentation de la demi-vie de circulation ainsi qu'une réduction des effets secondaires liés à l'IFN- γ libre ont également été observés (Li et al., 2012).

1.5 Synaptophysine (SYN)

Il y a peu d'études sur cette glycoprotéine membranaire, mais un groupe de chercheurs a développé un anticorps recombinant humain à chaîne unique, dirigé contre un domaine extracellulaire de la SYN. L'administration de cet anticorps à des souris atteintes de fibrose hépatique a induit une liaison spécifique aux HSCs activées, positives au α -SMA, dans le foie (Douglass et al., 2008a). Cet anticorps ne semble pas cibler les hépatocytes, ni les monocytes ni les macrophages hépatiques. Une limitation potentielle de cette stratégie est le risque

d'adressage des agents thérapeutiques également aux cellules neurales, en raison de l'expression de la SYN par ces dernières. Cependant, il n'y a aucune preuve montrant que cet anticorps puisse traverser la barrière hémato-encéphalique (Douglass et al., 2008b).

1.6 Récepteur à l'AH (Cluster of differentiation CD44)

Le CD44 est le principal récepteur de l'acide hyaluronique (AH), un composant important de la MEC. Il existe sous la forme de multiples variants d'épissage, exprimés par les lymphocytes infiltrants, les cellules de Kupffer et les HSCs (Sato et al., 2000). Une augmentation de son expression a été observée avec l'activation des HSCs (Kikuchi et al., 2005). Une surexpression de CD44 a été décrite chez des patients atteints de NAFLD ou d'une maladie hépatique alcoolique et dans des modèles animaux de fibrose ou de cirrhose (Urashima et al., 2000).

L'AH a été conjugué aux *Quantum Dots* (QDots), des nanocristaux fluorescents utilisés comme sonde dans le domaine de la bio-imagerie moléculaire. *In vitro*, une absorption plus importante des conjugués AH-QDot par les HSC-T6 et les cellules d'hépat-carcinome (HepG2) que par les hépatocytes sains (FL83B) a été observée. L'administration des conjugués AH-QDot à des souris atteintes de cirrhose hépatique induite par le CCl₄ a permis une internalisation spécifique dans les HSCs et les cellules endothéliales sinusoidales (Kim et al., 2010). La conjugaison de nanoparticules polymériques à base de polylactide, encapsulant la curcumine, à l'AH a également permis une internalisation spécifique des nanoparticules par les HSCs activées sans affecter les hépatocytes, chez des souris atteintes de fibrose hépatique induite par la thioacétamide. Ce système d'administration a permis de réduire la dose de la molécule sans diminuer l'efficacité thérapeutique (Chen et al., 2017a). Des résultats similaires ont été obtenus, en administrant par voie orale, des micelles encapsulant le losartan et conjuguées à l'AH, à des souris présentant une fibrose hépatique induite par un mélange thioacétamide/éthanol. Une accumulation plus importante des micelles conjuguées a été observée dans les foies fibrotiques que dans des foies sains (Thomas et al., 2015). De même, l'administration de micelles chargées de silibinine et conjuguées à l'AH (SLB-AH) à des rats atteints de fibrose hépatique induite par le CCl₄, a induit un effet de ciblage hépatique significatif. Des tests de cytométrie en flux et d'immunofluorescence ont révélé une internalisation spécifique des micelles SLB-AH dans les HSCs plutôt que dans les autres types de cellules hépatiques. De plus, les micelles présentaient un effet apoptotique sur les HSCs activées (Li et al., 2020).

Ainsi, les études décrites ci-dessus sur l'efficacité du ciblage des HSCs ont montré des résultats prometteurs, à la fois *in vitro* et sur des modèles animaux. La conjugaison de ligands spécifiques des HSCs aux agents anti-fibrotiques ou aux systèmes d'administration pourrait contribuer, de manière considérable, à la validation de ces agents dans les essais cliniques. Les principaux ligands de HSCs décrits dans ce chapitre sont des ligands non synthétiques, en raison de leur bonne biocompatibilité et biodégradabilité. Cependant, la liaison de ces ligands à leurs récepteurs est souvent de faible affinité et peut, pour certains d'entre eux, induire une activation des voies de signalisation en aval. Ces limites peuvent être contournées par l'utilisation de ligands artificiels, qui présentent une affinité plus élevée et sont plus flexibles pour la modification chimique et le couplage à des agents anti-fibrotiques. Parmi ces ligands artificiels, on trouve les aptamères et les peptides qui sont des ligands intéressants en raison de leur petite taille, de leur facilité de production et de leur non-immunogénicité (Chen et al., 2019).

2. Les approches thérapeutiques à base d'ARN interférents

Dans cette partie, nous allons développer, plus spécifiquement, les stratégies anti-fibrotiques à base de siRNA. Ce type de molécules agit au niveau de l'ARNm, nous allons donc décrire les différentes protéines cibles qui ont été visées par des siRNA.

2.1 Collagène et protéines associées

Des siRNA dirigés contre le procollagène $\alpha 1$ (Col1 $\alpha 1$) ont été encapsulés dans des nanoparticules à base de lipides cationiques et injectés en IV à des souris présentant une fibrose hépatique induite par le CCl₄. Une diminution de 90% de l'expression du collagène ainsi qu'une réduction de la formation des septa fibreux ont été observées. Ces nanoparticules induisaient également une régression significative de la fibrose biliaire sur un modèle de souris Mdr2^{-/-} sans entrainer de réponse immunitaire innée *in vivo* (Calvente et al., 2015). Des hydrogels cationiques ont également été développés pour vectoriser des siRNA anti Col1 $\alpha 1$. Administrés à des souris atteintes de fibrose induite par le CCl₄, ces nanohydrogels ont induit une diminution de l'expression du collagène à la fois au niveau transcriptionnel et au niveau protéique, sans aucune toxicité *in vivo* (Kaps et al., 2015). Le groupe de Schuppan a réalisé une étude très intéressante en concevant des souris transgéniques exprimant un shRNA dirigé contre Col1 $\alpha 1$, régulé par la doxycycline, ce qui permet une suppression inductible très efficace du gène *COL1A1* dans les myofibroblastes. Les souris traitées à la doxycycline et au

CCl₄ ont présenté une diminution de 80 à 90% de l'ARNm du procollagène $\alpha 1$, et une réduction de 40 à 50% de l'accumulation de collagène dans le foie. L'inhibition du procollagène $\alpha 1$ a également conduit à une diminution de l'expression des procollagènes de type III, IV et VI et d'autres paramètres liés à la fibrose comme l'expression de TGF β -1, TIMP-1, MMP-8, MMP-13, et α -SMA. Ces observations étaient associées à une atténuation de l'inflammation chronique, suggérant que le collagène de type I sert non seulement de composant cicatriciel majeur, mais également de modulateur d'autres collagènes et de promoteur de l'inflammation chronique (Molokanova et al., 2018).

Des siRNA anti Col1 α 1 ont également été administrés, en utilisant des vecteurs conjugués à la vitamine A notamment *via* des nanoparticules à base de matériaux de type lipide « *SS-cleavable proton-activated lipid-like materials* (ssPalms) » couplées à la vitamine A (ssPalma). Injectées à des souris atteintes de fibrose hépatique induite par le CCl₄, ces nanoparticules ont entraîné une inhibition significative de la production de collagène, sans effets secondaires observés, à la dose de 3 mg/kg de siRNA (Toriyabe et al., 2017). De même, des nanoparticules polymériques composées principalement de poly(lactide-co-glycolide)-polyspermine PEG-vitamine A (PLGA-PSPE-PEG-VA) ont été utilisées pour l'administration d'une combinaison de silibinine et de siRNA anti Col1 α 1 à des souris traitées au CCl₄. Ces nanoparticules ont induit une diminution du dépôt de collagène et une amélioration de la fibrose hépatique, en comparaison avec les souris injectées avec des nanoparticules ne contenant que la silibinine ou le siRNA anti-Col1 α 1 (Qiao et al., 2018).

Une autre stratégie pour inhiber l'expression du collagène consiste à cibler des protéines liées à l'expression du collagène, notamment α CP2, TANGO1 et HSP47.

L'accumulation anormale de la MEC lors de la fibrose hépatique est corrélée à l'augmentation du turnover ($t_{1/2}$) de l'ARNm de Col1 α 1. Ce $t_{1/2}$ passe de 1,5h dans les HSCs quiescentes à plus de 24h dans les HSCs activées (Lindquist et al., 2000; Sato et al., 2003). Cette stabilisation de l'ARNm de Col1 α 1 est assurée par une protéine, appelée α CP2 et codée par le gène PCBP2 (*Poly(rC)-binding protein 2*), qui se lie spécifiquement à la région 3'UTR de l'ARNm du Col1 α 1. Shukla et al. ont décrit qu'un siRNA dirigé contre PCBP2 diminue de manière significative la production de Col1 α 1 dans des cellules HSC-T6 activées par l'alcool (Shukla et al., 2011). Plus récemment, la même équipe a montré que ce même siRNA anti-PCBP2 inversait plusieurs effets pro-fibrogéniques induits par l'alcool ou par les cytokines inflammatoires, à la fois sur des HSCs primaires de rat, et sur la lignée HSC-T6. Une diminution de l'accumulation du collagène de type I, ainsi qu'une réduction de la prolifération et de la migration cellulaires ont été observées (Liu et al., 2017).

Le récepteur à l'IGF-II a été utilisé par plusieurs équipes pour l'administration de siRNA anti-PCBP2 aux HSCs notamment en utilisant un aptamère spécifique de l'IGF-IIR, conjugué à l'extrémité 3' du siRNA anti-PCBP2. Ces conjugués aptamère-siRNA ont présenté une inhibition de l'expression de PCBP2 *in vitro* sur des cellules LX-2 ainsi qu'une absorption hépatique élevée *in vivo* chez des rats traités par le CCl₄ (Chen et al., 2017b). L'administration de siRNA anti-PCBP2 *via* des nanocomplexes hybrides peptides/siRNA conjugués à l'IGF-II à des rats atteints de fibrose hépatique induite par le CCl₄, a provoqué une inhibition significative de l'expression de PCBP2 et du collagène de type I dans le foie, à la fois au niveau transcriptionnel et protéique, avec un effet anti-fibrotique important (Jain et al., 2019). Le peptide 431 a également été utilisé comme ligand pour l'administration de nanocomplexes composés de biotine PEGylée et de siRNA anti-PCBP2 aux HSCs. Comparé à la vitamine A et au cholestérol, le nanocomplexe conjugué au peptide 431 présentait un effet de ciblage plus important sur les cellules LX-2, la lignée HSC-T6 et les HSCs primaires activées de rat, accompagné d'une inhibition plus élevée de l'expression de PCBP2 et de la migration des HSCs activées. Le nanocomplexe couplé au peptide 431 présentait la plus forte absorption hépatique, et la plus faible accumulation dans les poumons et les reins, de rats atteints de fibrose hépatique induite par le CCl₄, comparé aux nanocomplexes conjugués au cholestérol ou à la vitamine A (Zhao et al., 2018).

TANGO1 est une protéine jouant un rôle potentiel dans la sécrétion du collagène de type I par le réticulum endoplasmique. Cette protéine est surexprimée dans les tissus hépatiques cirrhotiques murins et humains. L'inhibition de cette protéine par un siRNA spécifique réduit de 50% la sécrétion du collagène de type 1 par les cellules LX-2 en culture, sans affecter les autres protéines de la matrice. Cette rétention du collagène dans le RE favorise l'apoptose des HSCs *via* la réponse UPR suggérant un effet anti-fibrotique de l'inhibition de TANGO1 (Maiers et al., 2017).

Comme décrit précédemment (voir Chapitre II 3.7 Traitements ciblant la fibrose, page 102), HSP47 est une protéine chaperonne qui assure la formation de la triple hélice α du procollagène dans le réticulum endoplasmique. L'administration de siRNA ciblant la protéine gp46, l'homologue chez le rat de la protéine humaine HSP47, encapsulés dans des liposomes couplés à la vitamine A, à des rats atteints de cirrhose induite par DMN, induit leur accumulation dans les HSCs activées. Ces liposomes ont induit une diminution de la sécrétion du collagène, une résolution presque complète de la fibrose hépatique induite par le CCl₄ ou par BDL ainsi qu'un prolongement de la survie chez les rats atteints de cirrhose induite par DMN (Sato et al., 2008a).

2.2 Facteur de croissance transformant β (TGF- β)

Le TGF- β est le principal médiateur pro-fibrogénique. Comme évoqué dans le premier chapitre, le TGF- β est produit par les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales et les HSCs activées. Il peut se lier aux récepteurs TGF- β RI et TGF- β RII et régule la transcription des gènes impliqués dans la fibrogénèse *via* la voie de signalisation SMAD (Fabregat et al., 2016; Xu et al., 2016).

Des siRNA spécifiques du TGF- β 1, ont été conjugués au PEG, pour augmenter leur stabilité, et au M6P, pour permettre la distribution ciblée de siRNA aux HSCs. Le traitement des cellules HSC-T6 en culture par ces conjugués induit une inhibition importante de l'expression du TGF- β 1 (Zhu and Mahato, 2010). Des siRNA anti-TGF- β ont également été encapsulés dans des systèmes composés de PEI réductible conjuguée à l'AH pour un ciblage spécifique des HSCs. Les résultats obtenus *in vitro*, sur des HSC-T6, ont confirmé l'absorption cellulaire efficace du complexe par endocytose *via* les récepteurs à l'AH, avec une efficacité d'inhibition de TGF- β de 50 à 80% selon les conditions testées, sur des HSCs activées. Une diminution significative du nombre de HSCs activées et du dépôt de collagène ainsi qu'une réduction de la formation des nodules et une atténuation de la cirrhose hépatique ont été observées, après administration de ces complexes, à des souris traitées au CCl₄ (Park et al., 2011). Il a également été démontré que l'inhibition de l'expression du récepteur TGF- β RII par un shRNA, réduit, de manière significative, l'activation des HSCs *in vitro* en diminuant les niveaux d'expression du α -SMA, ainsi que la production d'autres composants de la MEC notamment les collagènes de type I, III et IV, et l'acide hyaluronique (Fu et al., 2011).

En raison du rôle complexe joué par le TGF- β dans le foie, de son expression ubiquitaire, ainsi que de celle de ses récepteurs dans tout l'organisme, il paraît stratégique de chercher plutôt à cibler dans les HSCs, des médiateurs en aval dans la voie de signalisation du TGF- β , plutôt que le TGF- β lui-même. Par exemple, le récepteur transitoire potentiel de la mélastatine 7 (TRPM7), une protéine du canal cationique impliquée dans la voie de signalisation TGF- β /SMAD, semble jouer un rôle important dans la prolifération des HSCs. Cette protéine est surexprimée dans les foies fibrotiques humains et son expression est augmentée, au niveau transcriptionnel et au niveau protéique, dans des HSC-T6 stimulées par le TGF- β . L'inhibition de TRPM7 avec un siRNA spécifique diminue l'expression des marqueurs de myofibroblastes induite par le TGF- β tels que α -SMA, ainsi que l'expression de Col1 α 1. De plus, son inhibition entraîne la dégradation des fibres de collagène, *via* l'augmentation de l'expression de MMP-13 et la diminution des niveaux de TIMP-1 et TIMP-2. Elle empêche aussi la phosphorylation de SMAD2/3 associée à la production de collagène, dans les HSCs activées *in vitro* et *in vivo* chez des rats traités au CCl₄ (Figure 55) (Fang et al., 2014). Gremlin 1 est une protéine

impliquée dans la phosphorylation de SMAD2/3, dans la voie de signalisation du TGF- β . Sa surexpression semble favoriser l'activation des HSCs. L'administration d'un siRNA spécifique de Gremlin1 à des rats traités au CCl₄, inhibe l'activation des HSCs et atténue la fibrose hépatique (Zeng et al., 2016).

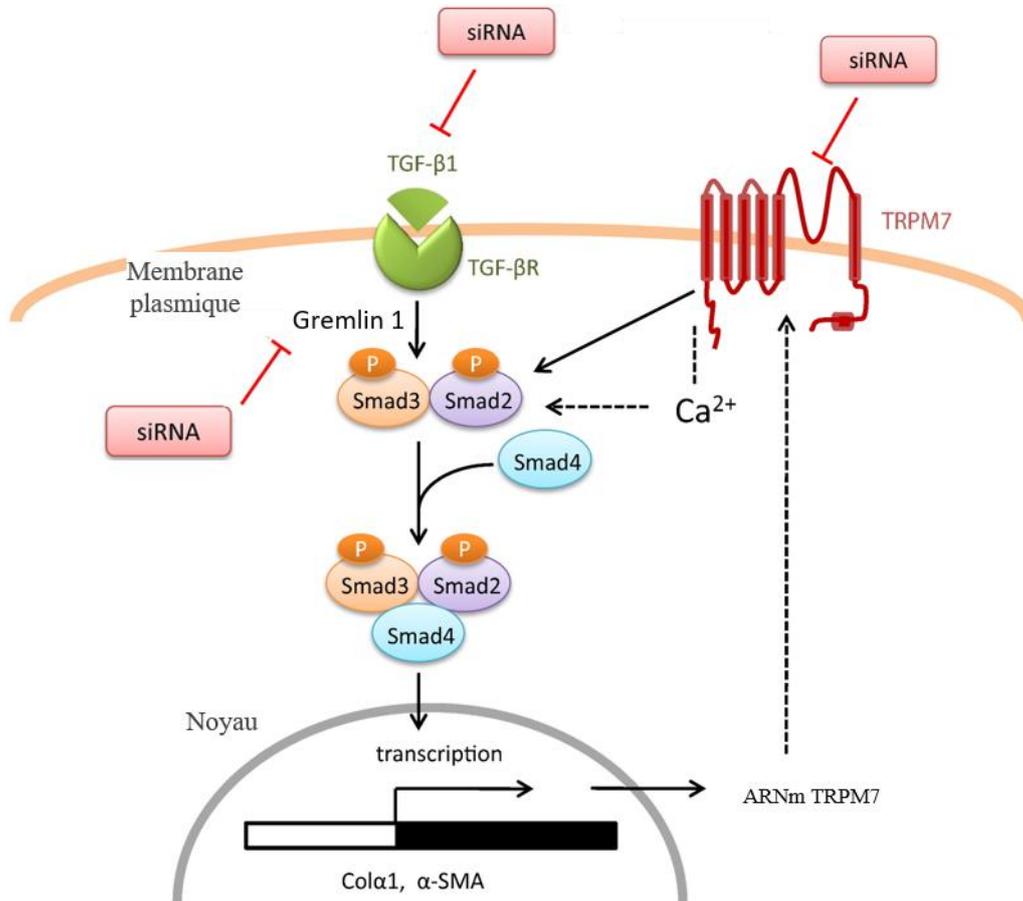


Figure 55 : Un modèle schématique d'une boucle de régulation positive entre TGF- β 1 / Smad et TRPM7.

2.3 Facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF)

Le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) est exprimé par plusieurs types de cellules hépatiques, notamment les hépatocytes, les cholangiocytes, les HSCs, les fibroblastes et les cellules endothéliales sinusoidales (Makino et al., 2018). Sa surexpression, lors de la fibrose, induit la prolifération des myofibroblastes et entraîne une accumulation de collagène (Huang and Brigstock, 2012; Shi-Wen et al., 2008).

Des nanoparticules lipidiques solides cationiques (cSLN), reconstituées à partir de LDL naturels, ont été conçues pour l'administration de siRNA anti-CTGF à des rats atteints de fibrose hépatique induite par DMN. L'injection IV de ces nanoparticules a induit une réduction significative de la quantité de collagène et des taux sériques des facteurs pro-fibrogéniques comme TNF- α , TGF- β , et IL-6. Une amélioration des caractéristiques histologiques de la

fibrose a également été mise en évidence (Kong et al., 2013). Trois plasmides exprimant des shRNA spécifiques du CTGF ont été construits et testés sur des cellules HSC-T6. L'une des constructions a induit une inhibition importante de l'expression de CTGF accompagnée d'une réduction de la production des protéines de la MEC comme les collagènes de type III et IV, la laminine et l'acide hyaluronique (Yuhua et al., 2008).

2.4 Facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)

Comme décrit précédemment, le facteur de croissance dérivé des plaquettes ou PDGF, produit par les HSCs, les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales, semble jouer un rôle important dans l'activation des HSCs *via* son récepteur PDGFR, surexprimé lors de la fibrose. Bloquer l'axe PDGF/PDGFR peut être une stratégie thérapeutique potentielle pour le traitement de la fibrose hépatique.

Un shRNA spécifique de la sous-unité β du récepteur PDGFR a été administré à des rats atteints de fibrose hépatique et a provoqué une diminution de l'expression de PDGFR- β , ainsi qu'une inhibition de l'activation et de la prolifération des HSCs. Une suppression de la progression de la fibrose hépatique a été mise en évidence sur deux modèles de fibrose induits par DMN et BDL (Chen et al., 2008).

PDGFR- α est une autre cible pour le traitement de la fibrose hépatique, son expression est augmentée dans les HSCs activées du foie cirrhotique, et dans les hépatocytes des foies fibrotiques. L'inhibition par un siRNA spécifique de PDGFR- α dans les hépatocytes co-cultivés avec des cellules LX-2 atténue l'activation des HSCs *via* la diminution de l'expression de α -SMA, de Col1 α 1, de TGF- β et de Smad2/3 (Lim et al., 2018).

2.5 MMPs et TIMPs

Il a été décrit que la MMP-2 est surexprimée dans les HSCs activées et joue un rôle important dans le processus de fibrogénèse. Des siRNA spécifiques de la MMP-2 encapsulés dans des liposomes conjugués à la vitamine A ont présenté à la fois une internalisation importante dans les HSC-T6 en culture et une diminution des niveaux d'expression protéique de α -SMA et du collagène de type I (LI et al., 2015).

Il a été démontré que les TIMP favorisent la fibrose hépatique en inhibant à la fois la dégradation de la matrice et l'apoptose des HSCs, contribuant ainsi à la production excessive de MEC. L'inhibition spécifique de TIMP-1 a permis une réduction significative de la prolifération des HSCs *in vitro* (Fowell et al., 2011). L'administration de shRNA spécifiques de TIMP-1 à des rats atteints de fibrose hépatique induite par le CCl₄ ou BDL induit une diminution des taux sériques d'ALAT et d'ASAT, une réduction des dépôts de collagène et une atténuation

de la fibrose hépatique (Cong et al., 2013; Zhu et al., 2015). De plus, une diminution de l'expression de MMP-2, de α -SMA, de TGF- β ainsi qu'une augmentation de l'expression de MMP-13 ont été observées dans le modèle BDL (Cong et al., 2013).

TIMP-2 est également surexprimé durant la fibrose hépatique. L'administration d'un siRNA modifié chimiquement dirigé contre TIMP-2, à des rats atteints de fibrose hépatique induite par le CCl₄ a atténué la fibrose hépatique et favorisé la dégradation de la MEC, *via* l'augmentation de l'expression de MMP-13. Une amélioration de la régénération des hépatocytes et une réduction du nombre de HSCs activées ont également été observées (Hu et al., 2007).

2.6 Autres protéines

La cycline E1 (CcnE1) est la sous-unité régulatrice de la kinase cycline-dépendante 2 (Cdk2), son expression est essentielle pour le contrôle du cycle cellulaire. L'inhibition de l'expression de CcnE1 par un siRNA spécifique empêche l'activation et la prolifération des HSCs et augmente leur apoptose à la fois dans des lignées cellulaires murine et humaine de HSCs et dans des cultures primaires murines de HSCs. L'administration de siRNA anti-CcnE1, encapsulés dans des liposomes, à des souris traitées par le CCl₄, atténue la réponse inflammatoire globale en réduisant les lésions hépatiques, la prolifération des hépatocytes, des leucocytes et des cellules non parenchymateuses. Cette inhibition empêche la progression de la fibrose hépatique (Bangen et al., 2017).

L'histone désacétylase 2 (HDAC2) est une protéine surexprimée dans les HSCs activées par le TGF- β , ou dans les foies fibrotiques de rats traités par le CCl₄. Inhiber son expression en utilisant un siRNA spécifique permet de diminuer les niveaux d'expression de Col1 α 1 et de α -SMA dans des HSC-T6 en culture activées par le TGF- β (Li et al., 2016)

L'apoptose des hépatocytes et la libération de ROS qui en résulte induit l'activation des HSCs *via* la phagocytose des corps apoptotiques. En inhibant ce processus apoptotique, on attend un potentiel effet thérapeutique. Pour tester cette stratégie, des siRNA dirigés contre des molécules pro-apoptotiques comme Bcl2, BH3, Bid et caspase 8 ont été testés, et ont induit une diminution de l'inflammation ainsi qu'une atténuation de la fibrose hépatique (Eguchi et al., 2016; Zender et al., 2003). Par exemple, des siRNA spécifiques de Bid ont été administrés *via* des vecteurs lipidiques, à des souris soumises à un régime CDAA, induisant une NASH accompagnée d'une fibrose sévère. L'expression de la protéine BID a été réduite à 10%, induisant une amélioration de la fibrose hépatique et une réduction de l'inflammation (Eguchi et al., 2016).

TAZ (*transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*), un coactivateur transcriptionnel qui joue un rôle dans la croissance des organes, a été décrit comme étant surexprimé dans les hépatocytes au cours de la NASH humaine. Un siRNA anti-TAZ conjugué à la N-acétylgalactosamine (GalNAc-siTAZ) a été injecté, en sous-cutané, à des souris atteintes de NASH induite par un régime alimentaire « NASH ». Le traitement injecté en préventif a induit une inhibition de l'inflammation, des lésions hépatocellulaires et de l'expression de médiateurs pro-fibrogéniques, accompagnée d'une diminution de la progression de la stéatose vers la NASH. Administré à des souris avec une NASH déjà établie, GalNAc-siTAZ a inversé de manière partielle l'inflammation, les lésions hépatocellulaires et la fibrose hépatique (Wang et al., 2019).

Les études décrites ci-dessus, réalisées *in vivo* et *in vitro*, ont montré le potentiel des siRNA pour inhiber de manière efficace et spécifique les gènes impliqués dans le processus de fibrogénèse. Divers systèmes de vectorisation (nanoparticules lipidiques, polymériques...) ont été développés pour une administration ciblée de siRNA. Les principales stratégies actuelles pour le traitement de la fibrose hépatique à base d'ARN interférents se sont concentrées sur le ciblage des cellules stellaires hépatiques pour l'inhibition de leur activation et de la production du collagène. De plus, comme décrit ci-dessus, la plupart des études *in vivo* ont été réalisées sur des modèles peu représentatifs de la fibrose hépatique métabolique, principalement le modèle CCl₄ ou le modèle BDL, et très peu d'études sont publiées sur les modèles métaboliques. Enfin, excepté les molécules de siRNA anti-HSP47 vectorisées dans des liposomes couplés à la vitamine A, toutes les molécules décrites ci-dessus sont encore aux stades précliniques. Cependant, avec l'approbation récente des deux premiers médicaments à base de siRNA (voir 6.2 Les siRNA commercialisés, page 158) l'utilisation thérapeutique d'ARN interférents devrait susciter l'intérêt des industries pharmaceutiques.

3. Approche multicellulaire et stratégie combinatoire

Une stratégie émergente pour augmenter l'efficacité des candidats anti-fibrotiques consiste à combiner des agents affectant simultanément plusieurs cibles et/ou voies physiopathologiques clés (moléculaires ou cellulaires) pour obtenir un effet synergique potentiel (Lemoinne and Friedman, 2019). Des essais cliniques, actuellement en cours, évaluent la combinaison de nouveaux médicaments dans la NASH.

Le ciloflexeur (un agoniste de FXR, ciblant la voie d'activation et de prolifération des HSCs) est actuellement évalué en association avec le Firsocostat (inhibiteur de l'acétyl-CoA carboxylase, ciblant le métabolisme lipidique) et le Sélonsertib (inhibiteur ASK1, ciblant la voie d'apoptose des hépatocytes) dans une étude de phase 2 incluant des patients NASH atteints de cirrhose (NCT03449446) ou sans cirrhose (NCT02781584). Une autre étude de phase 2 évalue la combinaison de Ciloflexor et Firsocostat avec le Sémaglutide (une molécule antidiabétique, agoniste GLP-1,) dans la NASH (NCT03987074). Le Tropifexor (agoniste FXR) est actuellement évalué en association avec le cénicriviroc (ciblant la voie de l'inflammation) (NCT03517540), ou la licogliflozine (une molécule antidiabétique, inhibiteur du co-transporteur sodium-glucose 2, SGLT-2) chez des patients NASH en phase 2 (NCT04065841) (Lemoinne and Friedman, 2019).

Bien que l'utilisation de siRNA soit une stratégie particulièrement appropriée pour une thérapie combinée, peu d'études se sont concentrées sur les mécanismes synergiques potentiels des siRNA dans les voies fibrogéniques (Huang et al., 2017). En effet, lorsque la formulation d'un vecteur est validée pour une administration efficace du siRNA à sa cible, il est tout à fait possible d'utiliser cette même formulation pour administrer plusieurs molécules de siRNA, sans devoir modifier le vecteur. Cette stratégie multi-cibles, utilisant des siRNA, a démontré son efficacité *in vitro* sur des fibroblastes pour le traitement de la fibrose cornéenne. Une combinaison de trois siRNA ciblant le TGF- β 1, le récepteur TGF- β R2 et le CTGF a provoqué une réduction significative de l'expression des gènes cibles (> 80%), de α -SMA (> 95%), et du collagène de type I, ainsi qu'une diminution de la migration cellulaire sans réduire la viabilité cellulaire (Sriram et al., 2013). Cette approche a également été testée par notre équipe sur un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde. L'administration intraveineuse à des souris arthritiques de lipoplexes contenant une combinaison de 3 siRNA ciblant 3 cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et IL-18) a induit une réduction de toutes les caractéristiques pathologiques de la maladie, avec un effet thérapeutique plus important par rapport aux groupes de souris traitées avec un seul des 3 siRNA (Khoury et al., 2008).

La stratégie de thérapie combinée est également bien explorée et constitue une approche puissante dans le traitement du cancer, en particulier la combinaison de siRNA avec d'autres

agents thérapeutiques, permet de réduire spécifiquement l'expression des gènes impliqués dans la résistance aux médicaments et l'inactivité chimio-thérapeutique (Babu et al., 2017). Une autre étude réalisée par notre équipe, sur deux modèles murins d'ostéosarcome, a montré que des injections intra-tumorales de lipoplexes contenant des siRNA ciblant RankL ont bloqué la progression tumorale, de manière significative lorsqu'ils étaient associés à l'ifosfamide, par rapport à la chimiothérapie seule (Rousseau et al., 2011)

Des essais précliniques et cliniques supplémentaires seront nécessaires pour explorer cette stratégie qui pourrait identifier une nouvelle thérapie pour la fibrose hépatique, ciblant idéalement les interactions entre les cellules, les médiateurs solubles, la MEC et ses récepteurs, et / ou la signalisation intracellulaire (Schuppan and Kim, 2013). Cependant, avec les outils actuels de développement et de validation de médicaments, il est peut-être difficile de réaliser une telle approche combinée. Tout d'abord, les tests de sécurité et d'efficacité d'un seul agent, même avec une conception optimale basée sur une biopsie, nécessiteront plusieurs centaines de patients, plusieurs années et un coût très élevé, avec un risque d'échec important. Ensuite, la combinaison de deux agents, ayant une efficacité et une sécurité prouvées, nécessiterait une autre série de validation clinique. De plus, différentes entreprises préféreront peut-être développer et commercialiser une monothérapie avec une efficacité limitée mais prouvée plutôt que d'investir un énorme effort supplémentaire dans la validation d'un produit prometteur de thérapie combinée. Enfin, le développement clinique de thérapies combinées, qui pourraient garantir une efficacité approfondie et une faible toxicité, n'est possible qu'avec des outils non invasifs améliorés pour l'évaluation de la fibrose (Trautwein et al., 2015).

Objectifs de thèse

Objectifs de thèse

La fibrose hépatique est la conséquence majeure des maladies chroniques du foie qui peuvent être associées à l'alcoolisme, aux hépatites virales ou encore aux maladies hépatiques non alcooliques (NAFLD). A l'heure actuelle, il n'existe aucune molécule anti-fibrotique efficace, la seule option thérapeutique pour les patients qui sont au dernier stade de fibrose est la transplantation hépatique. L'objectif de mon projet de thèse est de développer des stratégies de vectorisation de petits ARN interférents pour le traitement de la fibrose et d'évaluer leur efficacité dans un modèle murin approprié, qui induit une fibrose hépatique progressive dans un contexte de NASH et qui présente des caractéristiques physiopathologiques similaires à celles observées chez l'humain.

La première étape est de mettre en place dans le laboratoire le modèle murin CDAHFD, et de réaliser une analyse histologique et biochimique afin de suivre l'établissement de la fibrose au cours du temps. Ce modèle servira par la suite à évaluer des cibles moléculaires pertinentes et de caractériser plus particulièrement la cible cellulaire majeure pour les thérapies anti-fibrotiques : les cellules stellaires hépatiques. La deuxième étape de ce travail a pour objectif de développer une formulation efficace pour l'administration des siRNA aux cellules stellaires dans un foie fibrotique, puis d'identifier et de valider *in vitro* des séquences de siRNA capables d'éteindre l'expression de notre cible moléculaire. Enfin, la dernière étape vise à évaluer l'efficacité thérapeutique des vecteurs de siRNA développés sur le modèle de souris CDAHFD.

Au cours de la caractérisation histologique du modèle CDAHFD, nous avons constaté la présence d'un phénotype inattendu de cellules hypertrophiées sur les coupes hépatiques des souris. Nous avons alors mis en place des techniques afin de comprendre à quoi correspondait ce phénomène, de suivre son évolution avec la durée du régime et d'établir sa relation potentielle avec la fibrose. De plus, nous avons cherché la présence de ce phénotype particulier dans d'autres modèles murins de fibrose (MCD, HFHC, BDL, CCl₄) mais également chez des patients souffrant de fibrose hépatique liée à différentes étiologies.

Résultats

- I. Découverte de l'association de l'hypertrophie des cellules stellaires avec la fibrose hépatique dans des modèles murins et chez l'humain**

- II. Stratégie de vectorisation de siRNA pour l'inhibition de l'expression du collagène dans le modèle CDAHFD**

Chapitre I : Découverte de l'association de l'hypertrophie des cellules stellaires avec la fibrose hépatique dans des modèles murins et chez l'humain

1. Justification du choix du modèle de fibrose hépatique

Les modèles murins sont des outils puissants pour comprendre la pathogenèse et la progression d'une maladie mais également pour développer et tester de nouveaux agents thérapeutiques. Différents modèles de fibrose hépatique sont décrits dans la littérature, comme le modèle hépatotoxique CCl₄, largement utilisé pour l'étude de la fibrogénèse et l'évaluation de l'efficacité d'agents anti-fibrotiques en préclinique. Bien que ce modèle induise une fibrose hépatique sévère et rapide, il est peu représentatif des maladies hépatiques métaboliques comme la NASH, puisque l'étiologie de la fibrose est différente. En effet, les lésions hépatiques observées dans ce modèle sont dues à une attaque toxique répétée du foie, certaines caractéristiques pathologiques de la NASH humaine ne sont donc pas retrouvées.

Des modèles nutritionnels peuvent être utilisés afin de mimer les maladies hépatiques métaboliques, tels que le modèle MCD, qui reproduit plusieurs caractéristiques pathologiques de la fibrose hépatique humaine. Cependant, une limite majeure de l'utilisation de ce modèle est la perte de poids accrue des animaux associée à un risque de décès, limitant ainsi la durée des expérimentations et le niveau de fibrose hépatique obtenu.

En 2013, un nouveau modèle nutritionnel déficient en choline, supplémenté en méthionine (0,1%) et riche en lipides (60% des kcal apportées par les lipides), appelé CDAHFD (*Choline-Deficient L-amino acid-defined High-Fat Diet*), a été développé par l'équipe de Matsumoto. Ce régime associe la carence en nutriments essentiels, nécessaire pour le développement d'une stéatose hépatique, et la supplémentation en lipides, pour limiter la perte de poids des animaux. Ce modèle métabolique présente plusieurs avantages : il induit une fibrose hépatique marquée, apparaissant plus tôt que dans d'autres modèles nutritionnels. De plus, cette fibrose est observée dans un contexte de NASH : associant la stéatose et l'inflammation, avec une reproductibilité interindividuelle élevée. Enfin, la perte de poids des animaux est modérée et n'est associée à aucune mortalité (Matsumoto et al., 2013). La fibrose induite par

le régime CDAHf peut également progresser vers un carcinome hépatocellulaire, avec la formation de plusieurs nodules hépatiques visibles à la 24^{ème} semaine de régime (Ikawa-Yoshida et al., 2017).

Le modèle CDAHFD semble très intéressant pour étudier la fibrose hépatique ou évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, une trentaine d'études utilisant ce modèle métabolique ont été publiées entre 2017 et 2020. Par exemple, il a été utilisé pour évaluer l'efficacité du Cenicrivon (CVC), un double antagoniste des récepteurs 2 et 5 des chimiokines (CCR2 et CCR5), qui empêche l'infiltration de macrophages. Ce candidat-médicament fait actuellement l'objet d'une étude clinique pour le traitement de la fibrose hépatique (Kruger et al., 2018).

Pour ces nombreux avantages, le modèle murin CDAHFD a été choisi par notre équipe afin de développer de nouveaux agents thérapeutiques à base de siRNA pour la fibrose hépatique. Cependant, une seule étude avait été publiée sur ce modèle lorsque nous avons commencé ce projet (Matsumoto et al., 2013). Une caractérisation complète était donc nécessaire avant de commencer le développement des vecteurs de siRNA et l'évaluation de leur efficacité sur ce modèle.

2. Caractérisation du modèle CDAHFD

Le but de cette première partie du travail est de mettre en place le modèle métabolique, CDAHFD, et de caractériser, par différentes techniques histologiques et biochimiques, l'établissement de la fibrose hépatique. Des souris C57BL/6J mâles ont été soumises au régime CDAHf ou à un régime standard (SD) pendant 22 semaines et sacrifiées après 3, 6, 9, 12, 15, 18 ou 22 semaines de régime afin de suivre l'établissement de la fibrose. Les souris soumises au régime standard ou CDAHf seront appelées, respectivement, souris SD et souris CDAHFD. La durée du régime sera indiquée par un « s » suivi du nombre de semaines, par exemple : CDAHFD (s3) pour 3 semaines de régime CDAHf.

2.1 Modifications physiologiques chez les souris CDAHFD

Les souris ont été suivies et pesées une fois par semaine. Aucun changement de comportement n'a été observé. La Figure 56.A illustre l'évolution du poids moyen des souris CDAHFD et SD en fonction du temps.

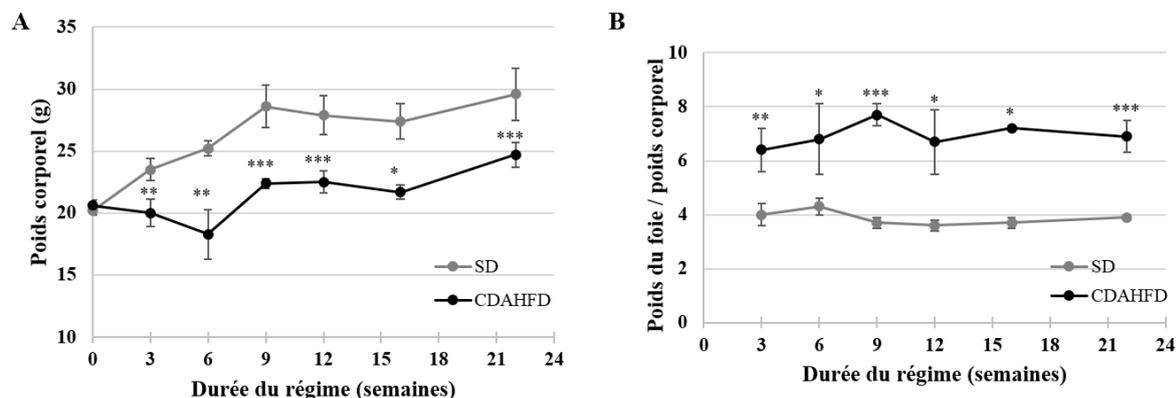


Figure 56 : Évolution temporelle du poids corporel et du poids du foie des souris CDAHFD ou SD.

(A) Suivi du poids corporel des souris CDAHFD et SD en fonction de la durée du régime. (B) Suivi du rapport du poids du foie sur le poids corporel des souris CDAHFD et SD. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. * $0.01 < p < 0.05$, ** $0.005 < p < 0.01$, *** $p < 0.001$, test Mann Whitney. (n = 5-10 pour chaque point).

Les deux groupes de souris présentent le même poids au début de l'étude. On remarque que le poids moyen des souris SD augmente constamment au cours des 9 premières semaines puis se stabilise autour de 30 g jusqu'à la fin de l'expérimentation. Au cours des 6 premières semaines de régime, le poids des souris CDAHFD diminue progressivement, puis augmente à la 9^{ème} semaine pour se stabiliser autour de 25 g jusqu'à la 22^{ème} semaine de régime en suivant la même courbe que celle des souris SD. La différence de poids observée entre les deux groupes est significative, quel que soit le temps de régime (Figure 56.A). Cependant, cette diminution de poids des souris CDAHFD par rapport au poids corporel des souris SD reste inférieure à 20% entre la 9^{ème} et la 22^{ème} semaine de régime.

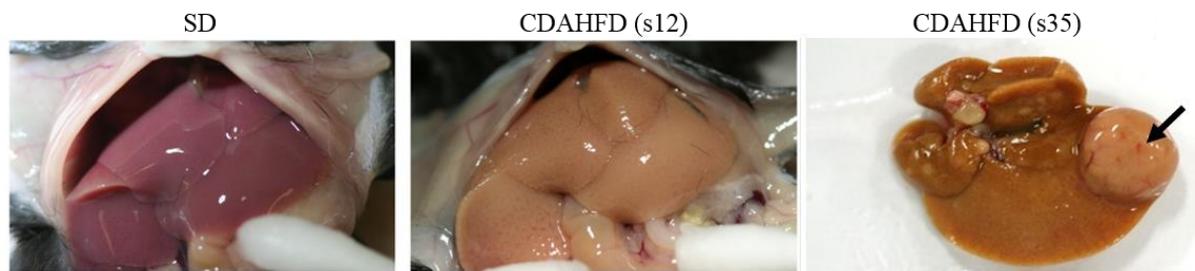


Figure 57 : Aspect macroscopique du foie des souris SD et CDAHFD après 12 et 35 semaines de régime.
Flèche : nodule hépatique.

Après sacrifice des souris, nous avons observé l'aspect macroscopique du foie des souris CDAHFD, qui est très différent de celui des souris SD, comme on peut le voir sur la Figure 57.

En effet, le foie des souris SD présente une couleur rouge, tandis que celui des souris CDAHFD (s12) est pâle, d'une couleur jaunâtre, avec des lobes dilatés. Une hépatomégalie (augmentation du volume du foie) est également observée dès 3 semaines de régime. A partir de la 16^{ème} semaine de régime CDAHF, le foie devient plus rigide et nous avons également remarqué la présence de nodules hépatiques dans le foie de certaines souris. A partir de la 30^{ème} semaine, toutes les souris CDAHFD développent plusieurs nodules hépatiques de taille variable (Figure 57). Les foies ont été récupérés et pesés. La Figure 56.B présente le rapport du poids du foie sur le poids corporel de la souris au cours du temps. Ce rapport est significativement plus important chez les souris CDAHFD par rapport aux souris SD, quel que soit le temps de régime, confirmant l'hépatomégalie du foie de souris CDAHFD.

Afin de suivre les biomarqueurs sanguins d'atteinte hépatique, une analyse biochimique a été réalisée sur les plasmas des souris CDAHFD et SD à différents temps de régime (Tableau 11).

Les souris CDAHFD présentent une augmentation très importante des enzymes hépatiques (ALAT et ASAT), d'environ 4 fois, dès la 3^{ème} semaine de régime. Cette augmentation significative est maintenue pour l'ASAT quel que soit le temps de régime, sauf à la 16^{ème} semaine, probablement en raison du faible nombre d'animaux sacrifiés (n=3 à la semaine 16). En revanche, l'augmentation des taux d'ALAT est significative uniquement aux semaines 3, 9 et 12. A l'inverse, une diminution significative des taux de cholestérol total et de glucose est observée dès la 3^{ème} semaine de régime, chez les souris CDAHFD. Cette diminution est maintenue pour le cholestérol jusqu'à la fin de l'expérimentation. Cependant, la différence du taux sanguin de glucose n'est plus significative à partir de la 9^{ème} semaine de régime. Les souris CDAHFD présentent également une augmentation significative des taux de bilirubine totale aux semaines 6, 12, 16, et 21. Enfin, aucune différence significative n'est observée dans les taux sanguins de triglycérides et d'albumine.

Ces résultats montrent que les souris CDAHFD présentent une hépatomégalie, probablement due à une accumulation de graisse dans le foie, ainsi qu'une augmentation du taux sérique des enzymes hépatiques ALAT et ASAT, signe d'une atteinte hépatique. La diminution observée du taux de cholestérol total est due à la déficience en choline qui empêche la synthèse de la phosphatidylcholine, impliquée la sécrétion des VLDL, provoquant ainsi une accumulation intrahépatique des triglycérides et du cholestérol. Ce modèle ne semble pas induire d'hyperglycémie, et probablement pas de résistance à l'insuline, comme cela a déjà été décrit par l'équipe de Matsumoto.

	Durée du régime CDAHFD (semaines)						
	Référence	3 ^b	6 ^b	9 ^b	12 ^b	16 ^b	21 ^b
<i>Biomarqueurs sanguins</i>							
ALAT (U/l)	107 ± 55 (7)	630 ± 321 (9)***	486 ± 323 (9)	417 ± 223 (6)**	287 ± 86 (7)***	240 ± 138 (3)	255 ± 106 (4)
ASAT (U/l)	165 ± 59 (7)	619 ± 228 (9)***	655 ± 394 (9)***	554 ± 305 (6)**	497 ± 140 (7)***	384 ± 166 (3)	394 ± 100 (4)**
Triglycéride (mmol/l)	0,79 ± 0,20 (7)	0,84 ± 0,27 (9)	0,73 ± 0,11 (5)	1,00 ± 0,40 (5)	0,73 ± 0,13 (7)	0,94 ± 0,08 (3)	0,56 ± 0,15 (4)
Cholestérol total	2,35 ± 0,24 (8)	1,38 ± 0,27 (8)***	1,15 ± 0,18 (9)***	0,96 ± 0,20 (7)***	1,17 ± 0,42 (8)***	1,92 ± 0,10 (3)	0,88 ± 0,36 (4)**
Bilirubine totale (µmol/l)	1,2 ± 0,7 (6)	1,5 ± 0,8 (4)	4,0 ± 1,3 (5)**	2,6 ± 1,2 (4)	3,6 ± 1,4 (6)*	3,2 ± 0,5 (3)*	5,1 ± 0,6 (4)*
Albumine (g/l)	24,8 ± 1,0 (5)	24,1 ± 0,4 (4)			22,1 ± 3,0 (3)		24,6 ± 1,1 (4)
Glucose (mmol/l)	12,7 ± 3,7 (7)	9,7 ± 2,7 (14)*	6,5 ± 0,7 (5)***	11,4 ± 1,4 (5)	9,1 ± 2,6 (14)	12,5 ± 4,8 (3)	9,1 ± 1,2 (4)

Tableau 11 : Évolution temporelle des biomarqueurs sanguins chez les souris CDAHFD.

Analyse biochimique des biomarqueurs sanguins chez des souris CDAHFD après différents temps de régime. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de souris testées. La valeur de référence est la valeur moyenne de chaque biomarqueur plasmatique chez des souris SD à 3, 6, 9, 12, 16 et 21 semaines. * 0,01 < p < 0,05, ** 0,005 < p < 0,01, *** p < 0,001, test Mann Whitney. b : CDAHFD vs référence.

2.2 Caractérisation histologique du modèle CDAHFD

Afin de déterminer l'effet du régime CDAHFD sur le tissu hépatique au cours du temps, une caractérisation histologique a été réalisée à l'aide de deux types de colorations sur des coupes de foie : une première coloration par l'Hématoxyline et l'Eosine (H&E), pour observer les lésions hépatiques et la morphologie du tissu et une seconde coloration par le Sirius Red et l'Hématoxyline, pour visualiser spécifiquement la fibrose (et les fibres de collagène). Les coupes colorées ont été analysées par le Dr. Frédéric Charlotte, un anatomopathologiste de l'hôpital la Pitié-Salpêtrière (Paris), et les lésions ont été interprétées selon le score NAS utilisé chez l'humain. Les principaux paramètres histologiques inclus dans ce score sont : la stéatose, l'activité inflammatoire, la ballonnisation hépatocellulaire et la fibrose.

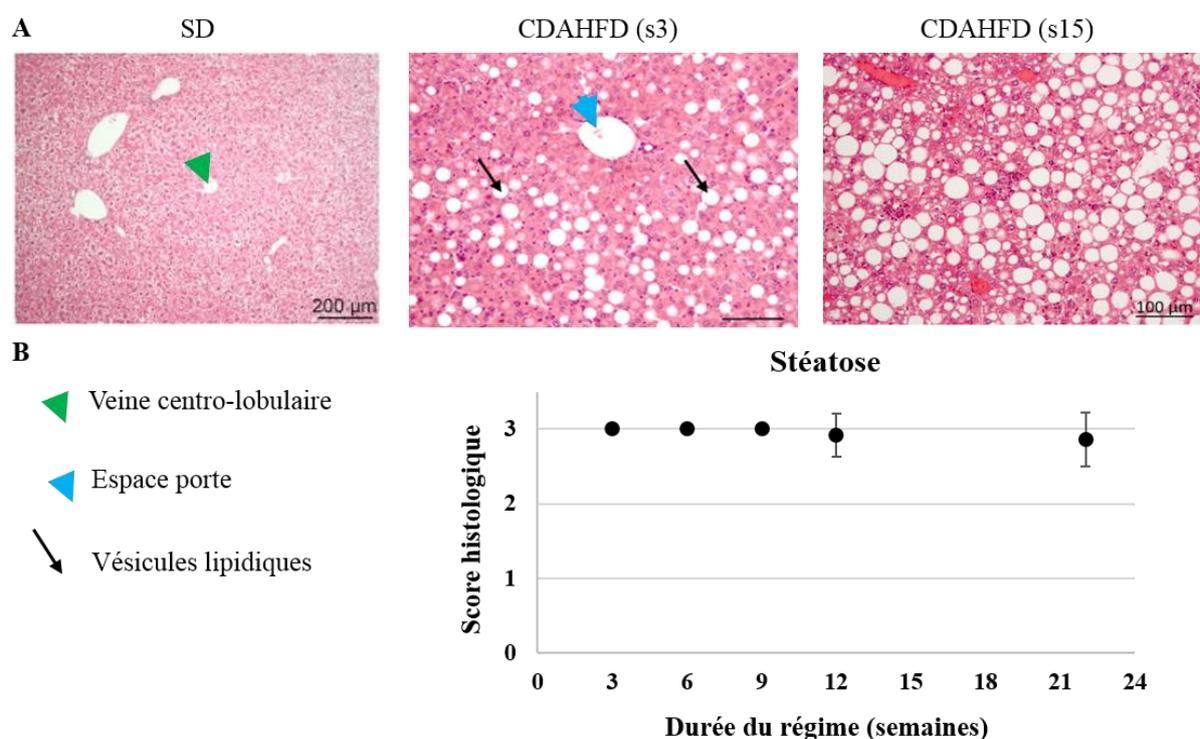


Figure 58 : Evaluation histologique de la stéatose sur le modèle CDAHFD.

A) Coupes de foie de souris SD ou CDAHFD aux semaines 3 et 12, colorées à l'Hématoxyline et l'Eosine. Barre d'échelle : 100 μ m B) Score histologique de la stéatose, en fonction du temps de régime CDAHFD. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. Les points correspondant à 3, 6 et 9 semaines ne sont pas associés à une barre d'erreur car pour ces points, les valeurs des scores sont identiques et l'écart-type est donc de 0. (n = 12-14 pour chaque point).

Le premier paramètre analysé est la stéatose, qui se manifeste sous la forme de vacuoles lipidiques présentes dans le cytoplasme des hépatocytes. Cette stéatose peut être micro-vésiculaire (multiples micro-vacuoles laissant le noyau en position centrale) ou macro-vésiculaire (présente sous la forme d'une seule grosse gouttelette qui déplace le cytoplasme vers la membrane et le noyau de manière excentrée). Le score caractérisant la stéatose varie

entre 0 et 3 en fonction de la surface du tissu occupée par les gouttelettes lipidiques : score 0 : s'il y a moins de 5% de la surface occupée par les gouttelettes lipidiques ; score 1 : entre 5 et 33% ; score 2 : entre 34 et 66% ; et score 3 : plus de 67% de stéatose intra-hépatocytaire.

En analysant les images obtenues par microscopie optique après coloration avec l'Hématoxyline et l'Eosine, on constate que l'aspect des coupes hépatiques des souris CDAHFD est très différent des souris SD, dès la 3^{ème} semaine de régime (Figure 58.A). Les coupes de foie des souris SD ne présentent aucune lésion hépatique tandis que pour les souris CDAHFD, des gouttelettes lipidiques de taille variable occupent plus de 70% de la surface totale de la coupe, ce qui correspond au stade 3 de la stéatose. A partir de la 6^{ème} semaine de régime, les vésicules lipidiques occupent plus de 90% de la surface totale de la coupe. L'état de stéatose reste stable jusqu'à la fin de l'expérimentation, comme le montre la Figure 58.B.

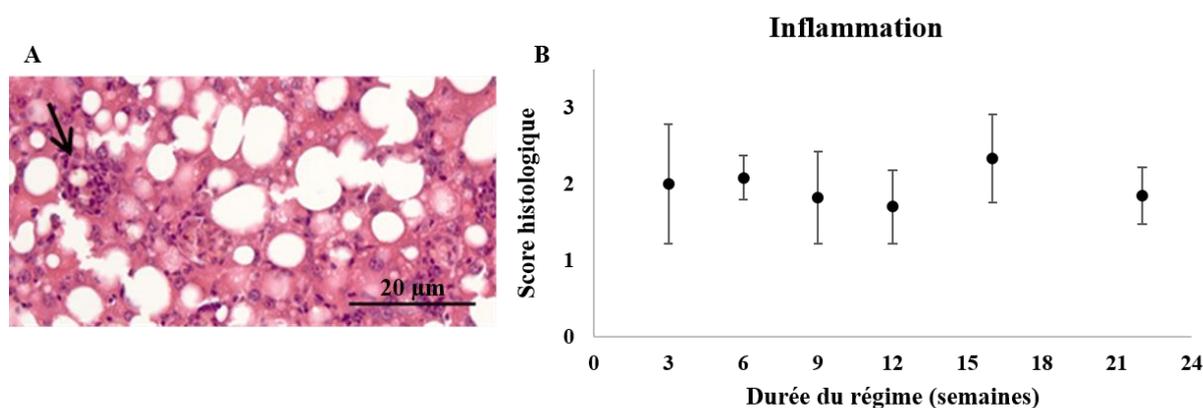


Figure 59 : Evaluation histologique de l'inflammation sur le modèle CDAHFD.

A) Un exemple de foyer inflammatoire (flèche). Barre d'échelle : 20 µm. B) Score histologique de l'inflammation, en fonction du temps de régime CDAHFD. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type. (n = 10-14 pour chaque point).

Le deuxième paramètre étudié est l'inflammation. Les foyers d'inflammation et d'infiltrats inflammatoires, représentés dans la Figure 59.A, sont comptés sur plusieurs champs microscopiques choisis aléatoirement par coupe et par souris, au grossissement 200X. Les valeurs attribuées sont entre 0 : pas de zone d'inflammation, 1 : un foyer d'inflammation par champ, 2 : deux foyers d'inflammation par champ et 3 : 3 zones d'inflammation ou plus par champ.

Un grade 2 pour l'inflammation lobulaire est observé à partir de la 3^{ème} semaine de régime CDAHFD et maintenu tout au long de l'expérimentation, avec des variabilités plus ou moins importantes selon les souris, par exemple, à la 3^{ème} semaine de régime, trois souris présentent un stade d'inflammation de 1, cinq souris sont au stade 2 tandis qu'un score de 3 est observé chez trois autres souris (Figure 59.B).

portale ; le stade 2 est défini par une fibrose centro-lobulaire et portale ; le stade 3 : une fibrose septale et enfin, le stade 4 : la cirrhose.

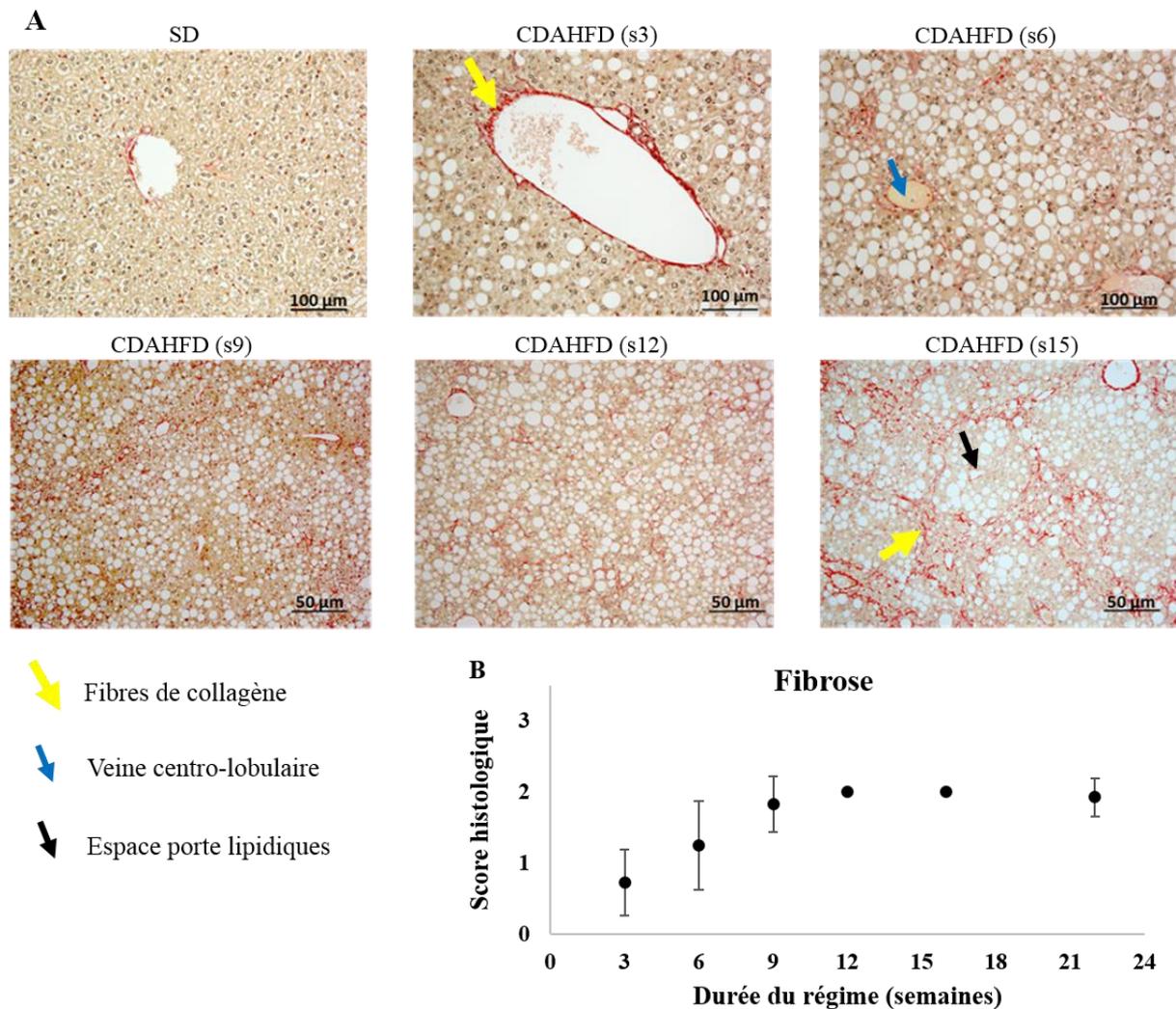


Figure 61 : Evaluation histologique de la fibrose hépatique sur le modèle CDAHFD.

A) Coupes de foies de souris SD et CDAHFD aux semaines 3, 6, 9, 12 et 16, colorées au Sirius Red et à l'Hématoxyline. Barre d'échelle : 100 μm (panneau du haut), 50 μm (panneau du bas). B) Scores histologiques de la fibrose, en fonction du temps de régime CDAHFD. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type. Les points correspondant à 12 et 15 semaines ne sont pas associés à une barre d'erreur car pour ces points, les valeurs des scores sont identiques et l'écart-type est donc de 0. (n = 10-14 pour chaque point).

En analysant les coupes de foies de souris CDAHFD colorées au Sirius Red, à la 3^{ème} semaine de régime, on remarque que les fibres de collagène se limitent aux parois vasculaires, ce qui est similaire aux coupes hépatiques des souris SD (Figure 61.A). Dès la 6^{ème} semaine de régime CDAHFD, une fibrose péri-sinusoïdale minimale est détectée sur les coupes histologiques des souris. Les fibres de collagène sont principalement localisées au niveau de la région centro-lobulaire et se limitent aux espaces péri-sinusoïdaux sans trop d'extension, ce qui correspond au stade 1a de la fibrose. Cette dernière évolue progressivement vers un stade marqué (1b), à partir de la 9^{ème} semaine de régime CDAHFD. A la 16^{ème} semaine, on remarque

la présence de fibres de collagène étendues, des ponts fibreux se sont établis allant d'une veine centro-lobulaire à l'autre sans envahir les espaces portes (Figure 61.A). Le stade de fibrose 1b reste constant jusqu'à la 22^{ème} semaine d'expérimentation (Figure 61.B).

Toutes les lésions hépatiques, décrites ci-dessus (stéatose, inflammation, et fibrose) sont particulièrement reproductibles puisqu'elles ont été retrouvées chez toutes les souris CDAHFD. L'expérimentation a été reproduite huit fois (N = 8) avec 15 à 30 souris soumises au régime CDAHF par expérimentation (n = 15-30).

2.3 Etude de l'expression protéique d'un marqueur de fibrose : le α -SMA

L'actine α du muscle lisse ou le α -SMA, est exprimée par les myofibroblastes. Cette protéine est largement utilisée comme marqueur de fibrose. L'analyse de l'expression protéique du α -SMA a été réalisée par Western Blot sur des lysats de foie de souris SD ou CDAHFD après 3, 6, 9 et 12 semaines de régime.

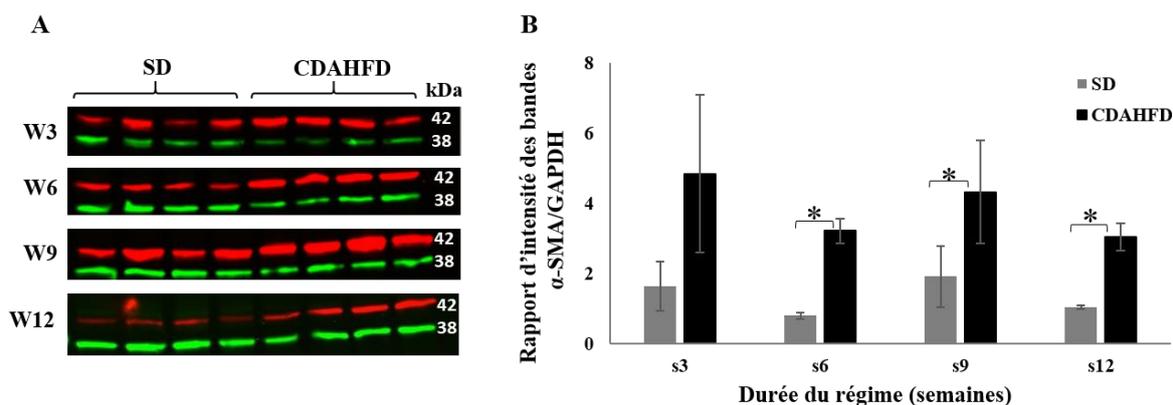


Figure 62 : Analyse de l'expression protéique du marqueur de fibrose α -SMA.

A) Résultats du Western Blot de l'actine α du muscle lisse (α -SMA) chez les souris SD et CDAHFD après 3, 6, 9 et 12 semaines de régime. La bande à 42 kDa (en rouge) correspond au α -SMA et celle à 38 kDa (en vert) correspond à la GAPDH. s = semaines de régime. B) Quantification des niveaux d'expression protéique. Les niveaux d'expression protéique du α -SMA ont été normalisés par la GAPDH. La quantification des intensités des bandes a été réalisée à l'aide du logiciel Fiji. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type (n = 4 par temps pour chaque groupe). * p < 0,05, test de Mann Whitney (CDAHFD vs SD pour chaque temps).

Une bande correspondant à la protéine α -SMA est observée à la fois dans le groupe SD et CDAHFD, ce qui indique que les souris des deux groupes expriment le α -SMA. Cependant, les intensités de ces bandes semblent moins importantes dans le groupe SD, par rapport au groupe CDAHFD (Figure 62.A). La quantification relative de l'expression du α -SMA est rendue possible par calcul des rapports d'intensité des bandes correspondant au α -SMA et au GAPDH. Cette protéine, exprimée par un « gène de ménage », est utilisée comme contrôle

interne pour les études expérimentales, pour corriger les variations entre les échantillons et les erreurs de quantification.

Alors qu'à 3 semaines de régime aucune différence significative de l'expression du α -SMA n'est observée entre les deux groupes de souris, une augmentation significative de l'expression du α -SMA est détectée à la 6^{ème} semaine de régime chez les souris CDAHFD. Cette différence est maintenue jusqu'à la 12^{ème} semaine, confirmant l'établissement de la fibrose hépatique dès la 6^{ème} semaine de régime CDAHFD, comme cela a déjà été observé en histologie.

Les résultats obtenus, après caractérisation histologique et biochimique des souris CDAHFD, confirment que ce modèle induit une fibrose hépatique progressive dans un contexte de NASH. L'établissement de la NASH et de la fibrose sont très reproductibles et ne sont associées à aucune mortalité. Dès la 3^{ème} semaine de régime, une augmentation des taux d'enzymes hépatiques, une stéatose ainsi qu'une inflammation lobulaire sont mises en évidence. Une légère fibrose péri-sinusoïdale est observée, accompagnée d'une augmentation de l'expression du marqueur de fibrose, le α -SMA dès la 6^{ème} semaine de régime. Enfin, les souris CDAHFD présentent une fibrose centro-lobulaire marquée (stade 1b) dès la 9^{ème} semaine de régime. Ce phénotype, de localisation centro-lobulaire des fibres de collagène, est observé chez des patients souffrant d'une fibrose hépatique métabolique, contrairement à la fibrose induite par les hépatites virales qui débute au niveau de la région portale.

3. Mise en évidence d'une hypertrophie cellulaire dans le modèle CDAHFD

3.1 Par microscopie optique

Une analyse plus approfondie des coupes de foie des souris CDAHFD, colorées à l'Hématoxyline & l'Eosine a révélé la présence d'amas de cellules présentant un cytoplasme gonflé, rempli de gouttelettes de couleur jaune (Figure 63.A flèche). Ces cellules, que l'on peut qualifier d'hypertrophiées, sont principalement localisées dans l'espace péri-sinusoïdal. De plus, l'analyse des coupes adjacentes colorées au Sirius Red montre que les cellules hypertrophiées sont entourées par des fibres de collagène (Figure 63.B, flèche). Un score a été établi avec le Dr. Frédéric Charlotte pour quantifier cet événement par observation à un grossissement de 200x, comme suit : 0 = aucune hypertrophie visible, 1 = cellules hypertrophiées petites et peu nombreuses, 2 = cellules hypertrophiées plus grosses et moins

de 10 cellules par champ microscopique, 3 = plus de 10 cellules hypertrophiées par champ microscopique.

Cette caractéristique histologique est détectable à partir de la 6^{ème} semaine de régime CDAHf avec une reproductibilité élevée (100% des souris CDAHfD présentent des cellules hypertrophiées), et augmente progressivement en suivant la même cinétique que celle de la fibrose (Figure 63.C).

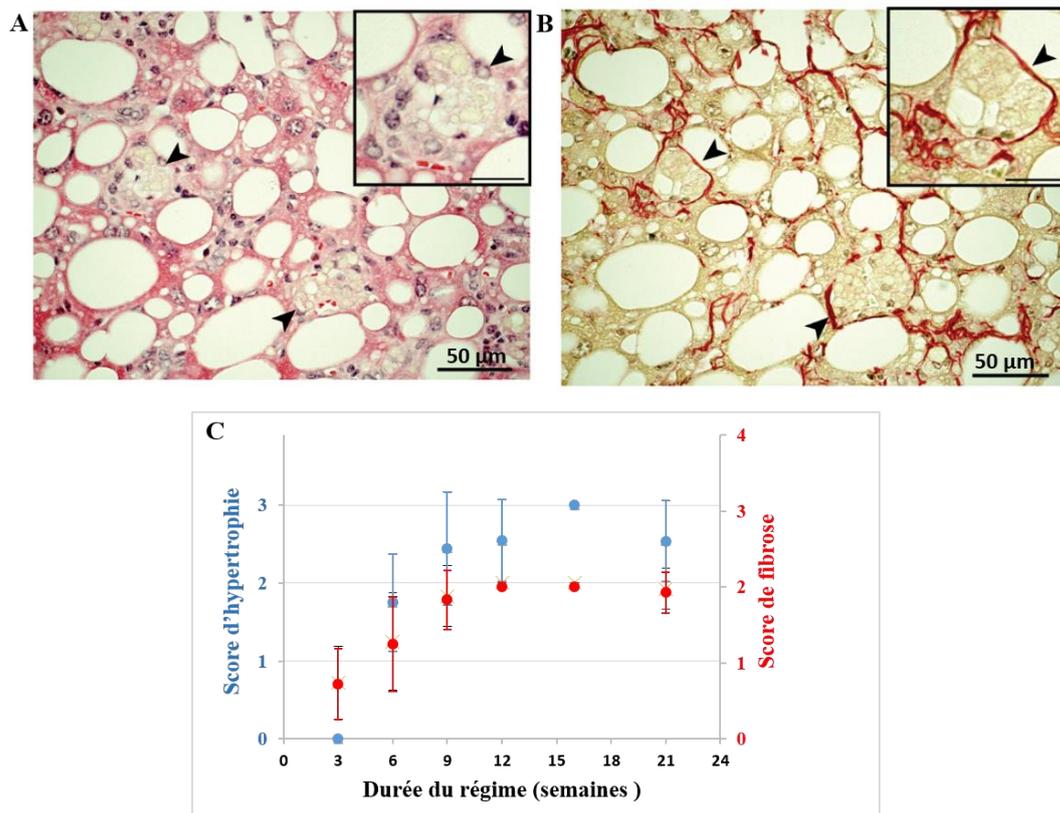


Figure 63 : Mise en évidence d'une hypertrophie cellulaire.

(A et B) Exemples de cellules hypertrophiées remplies de gouttelettes (A, coloration H&E) colocalisées (flèches) avec les fibres de collagène (B, coloration Sirius Red) sur les coupes de foies des souris CDAHfD (s9). Barre d'échelle : 50 µm, 20 µm pour l'insert (C) Scores d'hypertrophie cellulaire (points bleus) et de fibrose (points rouges) en fonction du temps de régime CDAHf. (n = 10-14 pour chaque temps, moyenne ± écart-type).

3.2 Par microscopie à fluorescence

Afin de mieux caractériser les cellules hypertrophiées, nous avons effectué une analyse par microscopie à fluorescence sur des coupes de foie de souris SD et CDAHfD. Les noyaux des cellules ont été marqués au DAPI. En observant les images obtenues, on remarque que l'aspect des coupes des deux groupes de souris est très différent. Sur les coupes de foie des souris SD (Figure 64.A), le tissu présente une fluorescence naturelle homogène, visible en vert sur l'image, et sur le zoom représenté dans la figure, on reconnaît un espace péri-sinusoidal (Figure 64.A, flèche). En revanche, sur la coupe hépatique de souris CDAHfD

(Figure 64.B), on remarque la présence de zones non marquées (noires) qui correspondent aux vacuoles lipidiques des hépatocytes, caractéristiques de la stéatose. De plus, on observe des zones d'accumulation importante de gouttelettes présentant un signal de fluorescence élevé, tandis qu'aucun signal de forte fluorescence n'est détecté sur les coupes de foie des souris SD (Figure 64.A). Ces zones fluorescentes présentes sur les coupes de foie des souris CDAHFD sont localisées au même endroit que les cellules hypertrophiées observées par microscopie optique, c'est-à-dire, au niveau de l'espace péri-sinusoïdal (Figure 64.B, flèche).

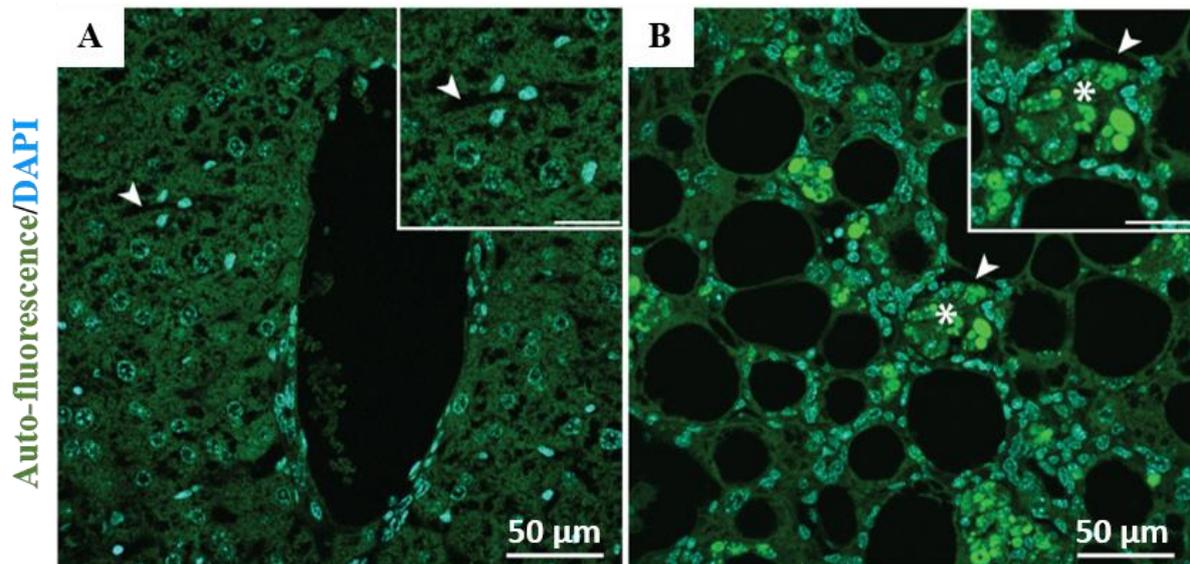


Figure 64 : Visualisation du signal de fluorescence dans les zones d'hypertrophie par microscopie à fluorescence.

Images superposées du signal de fluorescence (vert, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$) et du DAPI (cyan, $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$) sur des coupes de foie de souris SD (A) et CDAHFD (s9) (B). Flèches : espace sinusoidal, étoiles : gouttelettes fluorescentes. Barre d'échelle : 50 μm , 20 μm pour le zoom.

En raison de cette localisation péri-sinusoïdale des cellules hypertrophiées ainsi que de leur proximité avec les fibres de collagène, il est raisonnable de supposer que ces cellules sont des cellules stellaires (HSCs). L'un des rôles particulier des HSCs est de stocker le rétinol sous la forme de gouttelettes de rétinoïdes qui possèdent des propriétés d'auto-fluorescence naturelle bien caractérisées (Friedman, 2008a). Nous avons donc émis l'hypothèse que ces gouttelettes fluorescentes observées en microscopie à fluorescence soient des gouttelettes de rétinoïdes.

3.3 Analyse spectrale

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons décidé de réaliser une analyse spectrale de ces gouttelettes fluorescentes observées sur les coupes de foie des souris CDAHFD. Pour obtenir le spectre de référence spécifique des rétinoïdes, des cellules stellaires primaires ont été isolées à partir de foie de souris SD. La Figure 65.A montre une image microscopique, en lumière blanche, d'une cellule stellaire primaire. On remarque la présence de plusieurs gouttelettes dans le cytoplasme cellulaire. En observant la même cellule, après une excitation avec un laser à 405 nm, on constate que les gouttelettes qu'elle contient présentent une fluorescence naturelle (Figure 65.B). Cette fluorescence des gouttelettes est une signature caractéristique des HSCs.

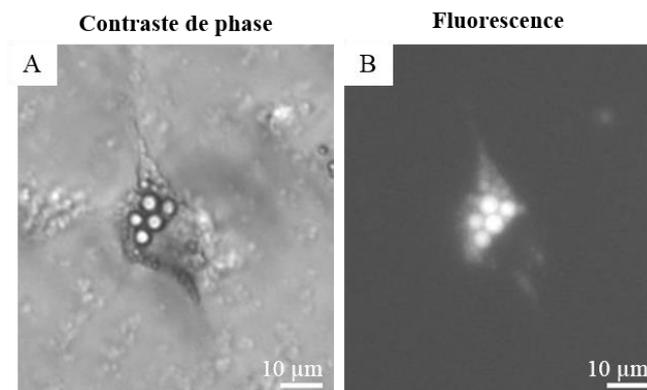


Figure 65 : Images microscopiques des HSCs primaires isolées d'un foie de souris SD.

L'image est obtenue sous une lumière blanche en contraste de phase (A) ou après une excitation fluorescente ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$) (B). Barre d'échelle : 10 μm .

Une analyse spectrale a ensuite été réalisée à la fois sur les gouttelettes fluorescentes présentes dans les HSCs primaires et sur celles observées sur les coupes de foie des souris CDAHFD, comme cela est illustré dans la Figure 66.A et B. Pour cela, les deux types d'échantillons ont été excités avec un laser ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$) et le signal d'émission a été collecté entre 420 et 650 nm.

La Figure 66.C, montre le spectre d'émission de fluorescence obtenu des gouttelettes de HSCs primaires (en bleu), caractéristique des rétinoïdes. Le spectre d'émission de fluorescence obtenu au niveau des zones d'hypertrophie sur les coupes de foie de souris CDAHFD (en orange), est superposable à celui des HSCs primaires. Cette analyse spectrale confirme que les gouttelettes fluorescentes observées sur les coupes de foie de souris CDAHFD correspondent bien à des gouttelettes de rétinoïdes.

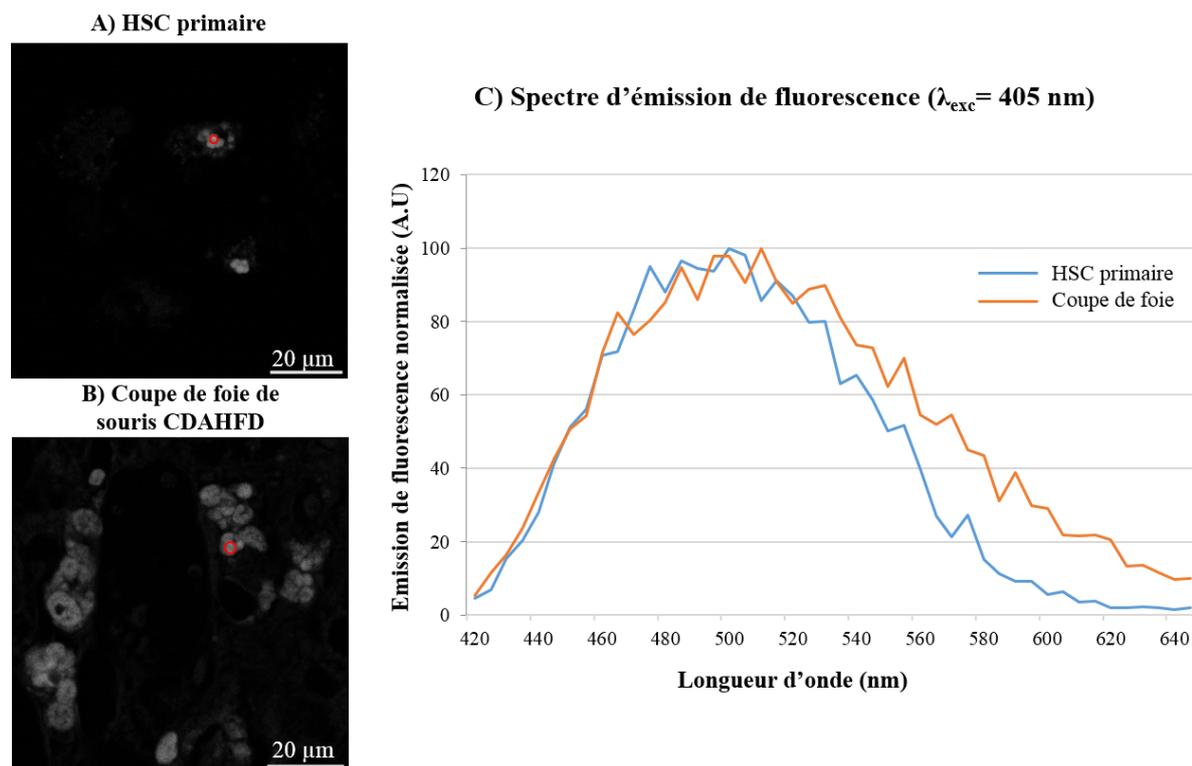


Figure 66 : Analyse spectrale des gouttelettes fluorescentes de rétinoides dans des HSCs primaires et sur des coupes de foie des souris CDAHFD.

Images de microscopie de fluorescence de HSCs primaires isolées d'un foie de souris SD (A) et d'une coupe de foie de souris CDAHFD, sous illumination à 405 nm (B). Les zones d'intérêt sur lesquelles l'analyse spectrale a été réalisée sont entourées en rouge. Barre d'échelle : 20 μm . (C) Spectres d'émission de fluorescence normalisés des gouttelettes de rétinoides dans les HSCs primaires (en bleu) et dans les zones des cellules hypertrophiées sur une coupe de foie de souris CDAHFD (s12) (en orange), mesurés par microscopie confocale ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 420\text{-}640 \text{ nm}$).

Nous avons ensuite vérifié que l'excitation des gouttelettes de rétinoides avec un laser à 480 nm, permettrait de donner un spectre spécifique des rétinoides afin de pouvoir, par la suite, utiliser le laser à 405 nm pour détecter le signal du DAPI marquant les noyaux, sans interférence avec le signal des rétinoides. Pour cela, les gouttelettes de rétinoides présentes dans les HSCs primaires et sur les coupes de foie de souris CDAHFD sont excitées avec un laser avec $\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$, et le signal d'émission est détecté entre 490 et 790 nm. La Figure 67 montre que les deux spectres obtenus sont là encore superposables. Cela nous permettra, pour la suite des expériences, de réaliser plusieurs marquages simultanément, et de recueillir un signal spécifique de chaque marqueur sur la même coupe : DAPI ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{max.em} = 470 \text{ nm}$), Rétinoides ($\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{max.em} = 540 \text{ nm}$) et marqueurs d'intérêt ($\lambda_{exc} > 550 \text{ nm}$, $\lambda_{max.em} > 560 \text{ nm}$).

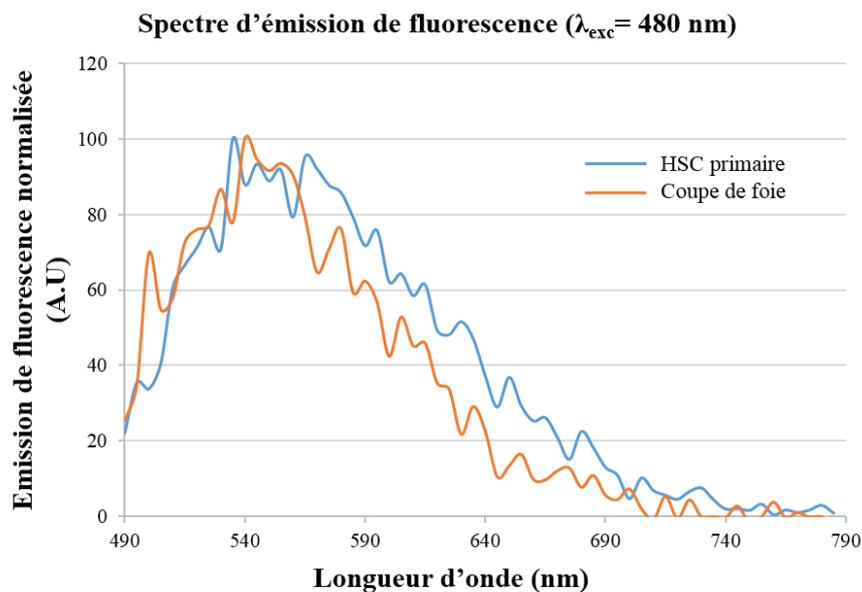


Figure 67 : Spectres d'émission de fluorescence normalisés des gouttelettes de rétinoides.

Le spectre d'émission de fluorescence, mesuré par microscopie confocale, des gouttelettes de rétinoides dans les HSCs primaires est en bleu et sur la coupe de foie de souris CDAHFD (s12) est en orange ($\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 490\text{-}790 \text{ nm}$).

Ces résultats montrent que l'hypertrophie cellulaire, identifiée sur les coupes des souris CDAHFD, est due à une accumulation de gouttelettes de rétinoides dans le cytoplasme des cellules hypertrophiées. Dans la littérature, une telle hypertrophie a été décrite comme étant associée à l'hypervitaminose A, mais n'a jamais été évoquée dans un contexte de fibrose hépatique. A l'inverse, une perte des gouttelettes de rétinoides a toujours été observée lors de l'activation des cellules stellaires et de leur dédifférenciation en myofibroblastes, au cours du processus de fibrogénèse. De plus, une diminution de la quantité des rétinoides a souvent été mise en évidence chez des patients atteints de NASH ou dans des modèles expérimentaux de fibrose hépatique. Une hypothèse que l'on ne peut pas écarter, est que le régime CDAHFD induirait un sur-stockage des rétinoides et que le phénomène d'hypertrophie soit dû à une toxicité du modèle. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons décidé de réaliser un dosage global des rétinoides dans le foie des souris CDAHFD en fonction du temps de régime.

3.4 Quantification des rétinoïdes dans le foie

Le dosage des rétinoïdes a été réalisé sur des lysats de foie de souris CDAHFD et SD par HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) à différents temps de régime. Deux rétinoïdes ont été sélectionnés pour la quantification des rétinoïdes, les esters de rétinyle qui représentent la forme de stockage majeure des rétinoïdes dans le foie, et le rétinol qui correspond à la forme de transport. En effet, les esters de rétinyle stockés dans les cellules stellaires sont hydrolysés en rétinol avant d'être libérés dans la circulation. Pour réaliser ce dosage, la procédure d'extraction des rétinoïdes à partir de lysats de foie ainsi que la méthode de séparation et de quantification par HPLC ont été optimisées à partir des études décrites dans la littérature (Kane et al., 2008; Venne et al., 2016).

3.4.1 Optimisation et mise au point du protocole d'extraction des rétinoïdes

Afin d'obtenir des lysats de foie homogènes, trois techniques différentes ont été testées :

- En écrasant le foie congelé dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier, puis en le mélangeant avec le tampon de lyse ;
- En broyant le foie avec un broyeur électrique (T8 ULTRA-TURRAX®) directement dans le tampon de lyse ;
- En broyant le foie avec un broyeur à billes (homogénéiseur PRECELLYS®) dans le tampon de lyse.

Les solutions obtenues sont ensuite homogénéisées à l'aide d'un sonificateur à ultrasons. Avec le broyeur à billes PRECELLYS®, un lysat homogène est obtenu, tandis qu'avec les deux autres techniques, des agrégats de foie restent dans la solution. Cette méthode a donc été retenue pour l'obtention des lysats de foie.

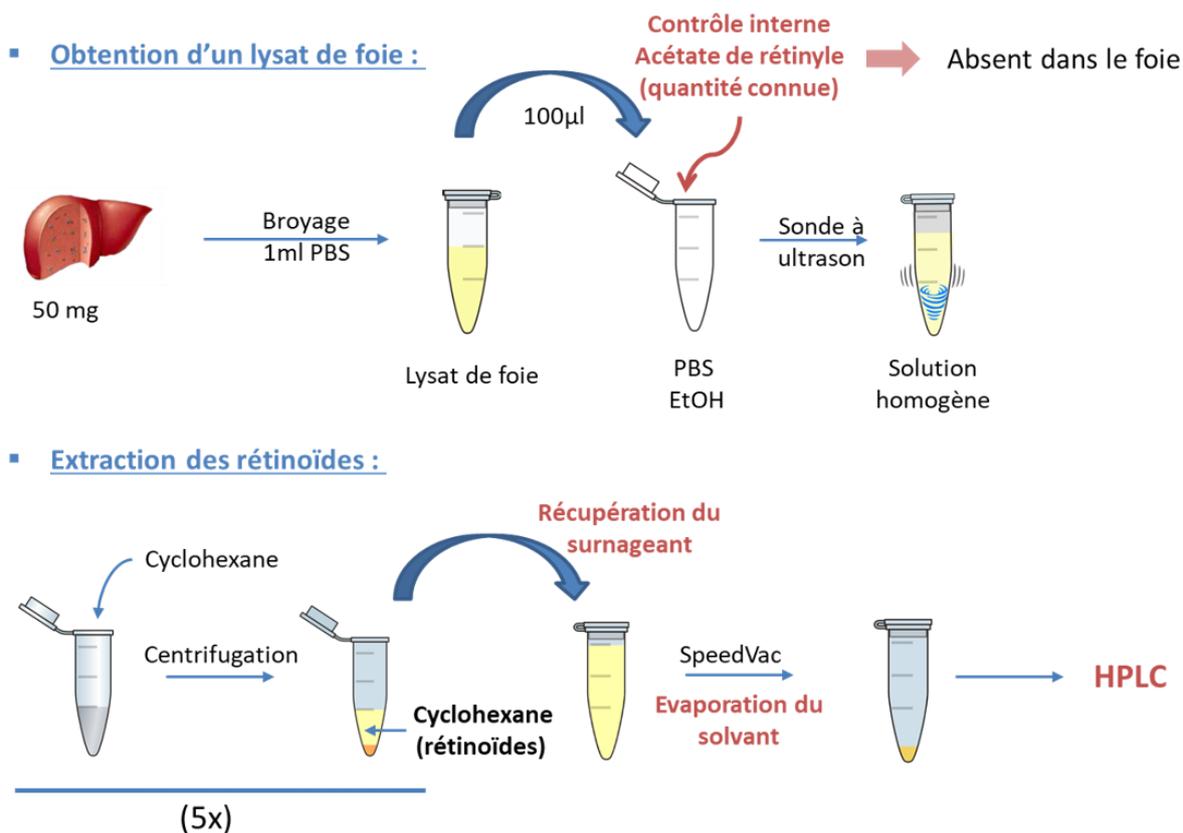


Figure 68 : Schéma décrivant le protocole optimisé d'extraction des rétinoïdes à partir d'un lysat de foie

Les lysats de foie ainsi obtenus contiennent plusieurs composés lipidiques pouvant interférer avec l'analyse des rétinoïdes. Les échantillons ne peuvent donc pas être injectés directement dans la colonne chromatographique sans une étape d'extraction. Pour cela, l'extraction liquide-liquide, une technique commune pour la séparation des produits organiques, a été utilisée. Cette méthode consiste à séparer les rétinoïdes des autres composés en divisant l'échantillon entre deux phases immiscibles. La capacité à séparer le mélange dépend de la solubilité relative de chaque composé dans les deux solvants immiscibles. Afin d'évaluer l'efficacité d'extraction, on ajoute dans le lysat un contrôle interne : l'acétate de rétinyle. Les rétinoïdes sont isolés du mélange en utilisant le cyclohexane comme phase organique dans lequel ils seront dissous. Le protocole d'extraction décrit par l'équipe de Kane, que nous avons adapté, consiste à ajouter un volume de 4 ml de cyclohexane au lysat et de récupérer, après centrifugation, la phase organique. Cette étape est répétée 3 fois avant d'évaporer le cyclohexane au RotaVap pour concentrer les rétinoïdes (Kane et al., 2008). Afin d'obtenir de meilleurs rendements, une optimisation du protocole a été effectuée en diminuant le volume de cyclohexane à 400 µl et en répétant la même étape cinq fois. Le solvant est ensuite évaporé au Speedvac. Le protocole optimisé est décrit dans la Figure 68.

3.4.2 Dosage des rétinoïdes par HPLC

Le principe de dosage par HPLC est basé sur l'équilibre des composés entre deux phases dont une est dite « stationnaire » : emprisonnée dans la colonne et l'autre est dite « mobile » : qui se déplace en entraînant les substances différemment selon leur solubilité dans cette phase, conduisant ainsi à leur séparation.

Plusieurs phases mobiles décrites dans la littérature pour la séparation des rétinoïdes ont été testées comme un mélange d'acétonitrile (ACN), de méthanol et de dichlorométhane à différents rapports volumiques (70/15/15) ou (90/5/5) (Kane et al., 2008; Venne et al., 2016). Cependant, aucune d'entre elles n'a permis la séparation des deux pics chromatographiques du rétinol et de l'acétate de rétinyle. Deux phases mobiles différentes ont alors été utilisées successivement une première, pendant dix minutes, composée d'ACN, d'H₂O et acide formique (89/11/0,1) puis une deuxième, pendant dix minutes, contenant l'ACN, le méthanol et le dichlorométhane (70/15/15). Ces deux phases mobiles permettent de séparer les trois formes de rétinoïdes : le rétinol est élué à 2,6 min, l'acétate de rétinyle à 4,3 min et les esters de rétinyle à 13,5 min. La Figure 69 montre un chromatogramme-type obtenu après analyse d'un mélange de ces trois composés.

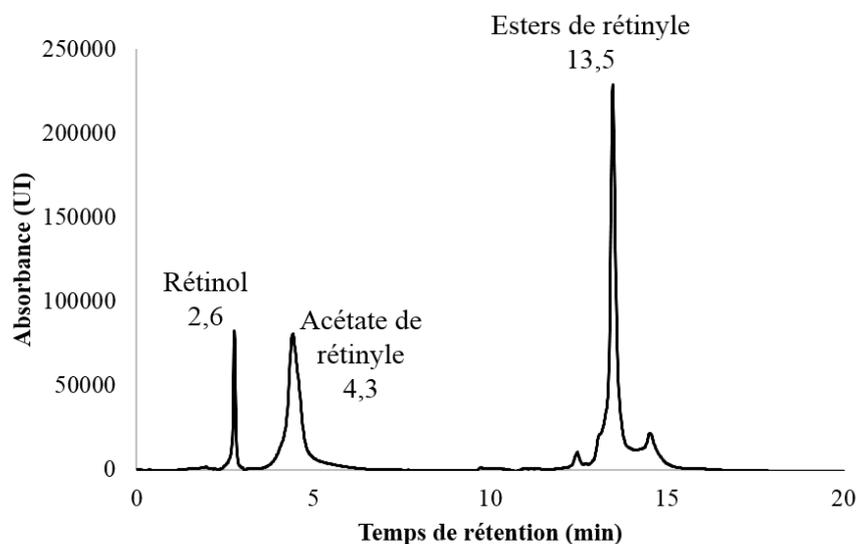


Figure 69 : Exemple d'un chromatogramme HPLC/UV obtenu sur un mélange de rétinoïdes.
Temps de rétention : rétinol (2,6 min), acétate de rétinyle (4,3 min) et esters de rétinyle (13,5 min).

Les quantités des rétinoïdes sont déterminées en mesurant l'aire sous le pic chromatographique de chaque produit, et par comparaison avec une gamme étalon, comme décrit dans la partie Matériels et méthodes. Les résultats de quantification des rétinoïdes sur des lysats de foie de souris SD et CDAHFD, en fonction du temps, sont décrits dans la Figure 70.A pour les esters de rétinyle, et Figure 70.B pour le rétinol.

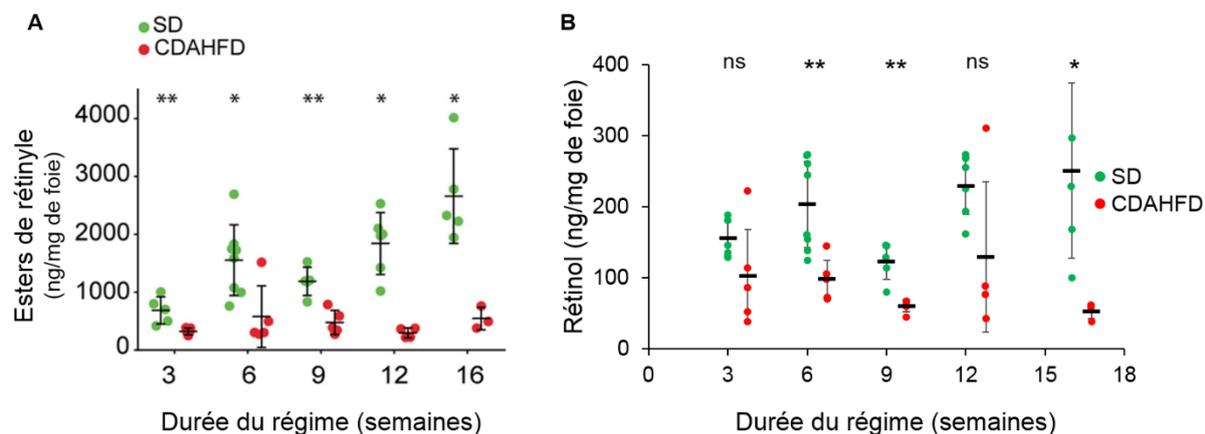


Figure 70 : Quantification des rétinoïdes dans le foie de souris CDAHFD et SD par HPLC.

Quantité totale des esters de rétinyle (A) et de rétinol (B) dans le foie de souris CDAHFD (points rouge) et SD (points verts) mesurée par HPLC, en fonction du temps de régime. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type, $n=4-7$ pour chaque condition. * $0.010 < p < 0.05$; ** $p < 0.010$. Test de Mann-Whitney (SD vs CDAHFD, n.s. non significatif).

Chez les souris SD, le taux des esters de rétinyle a tendance à augmenter avec le temps de régime. Il est de 581 ng/mg de foie à la 3^{ème} semaine, et il atteint 1909 ng/mg de foie à la 16^{ème} semaine de régime, avec des variabilités interindividuelles importantes quel que soit le temps de régime (écart-type compris entre 104 et 259 ng/mg). Au contraire, ce taux reste bas chez les souris CDAHFD, il est inférieur à 350 ng/mg de foie quel que soit le temps de régime, avec des variabilités plus faibles comparées aux souris SD (écart-type : 26-107 ng/mg de foie). La quantité des esters de rétinyle dans le foie des souris CDAHFD est significativement plus faible que celle des souris SD dès la 3^{ème} semaine de régime. Cette différence significative est maintenue jusqu'à la 16^{ème} semaine (Figure 70.A).

Des résultats similaires sont obtenus pour le rétinol. Les quantités globales de rétinol dans le foie des souris SD sont comprises entre 107 et 232 ng/mg de foie, quel que soit le temps de régime, tandis que chez les souris CDAHFD, ces quantités sont plus faibles et varient entre 90 ng/mg à la 3^{ème} semaine et 44 ng/mg de foie à la 16^{ème} semaine de régime. Malgré une variabilité très importante (écart-type : 5-48 ng/mg de foie) entre les individus du même groupe, la quantité de rétinol dans le foie des souris CDAHFD est significativement plus faible que chez les souris SD aux semaines 6, 9 et 16 (Figure 70.B).

Ces résultats confirment la diminution des quantités globales de rétinoïdes dans le foie des souris CDAHFD, ce qui est cohérent avec les données de la littérature et le dogme de la perte de gouttelettes de rétinoïdes au cours du processus de fibrogénèse, permettant ainsi d'écarter l'hypothèse d'hypervitaminose A induite par le régime CDAHFD. Cependant, cela peut paraître contradictoire avec les observations

histologiques décrites précédemment, mettant en évidence, sur les coupes histologiques des souris CDAHFD, une accumulation localisée de rétinoïdes, alors qu'aucun signal de fluorescence des rétinoïdes n'est observé sur les coupes de foie des souris SD, qui pourtant contiennent des quantités importantes de rétinoïdes. Une hypothèse possible est que chez les souris SD, les rétinoïdes soient stockés dans de nombreuses cellules, en quantités suffisamment faibles pour être indétectables par fluorescence sur des coupes hépatiques fines. Le signal serait ainsi inférieur à la limite de détection du microscope à fluorescence.

Pour évaluer cette hypothèse, nous avons réalisé des coupes de foie de souris SD plus épaisses (50 μm , à l'aide du vibratome) et nous les avons observées au microscope confocal. Un signal de fluorescence de rétinoïdes a ainsi pu être détecté, principalement dans les zones péri-sinusoidales comme on peut le voir sur la Figure 71.

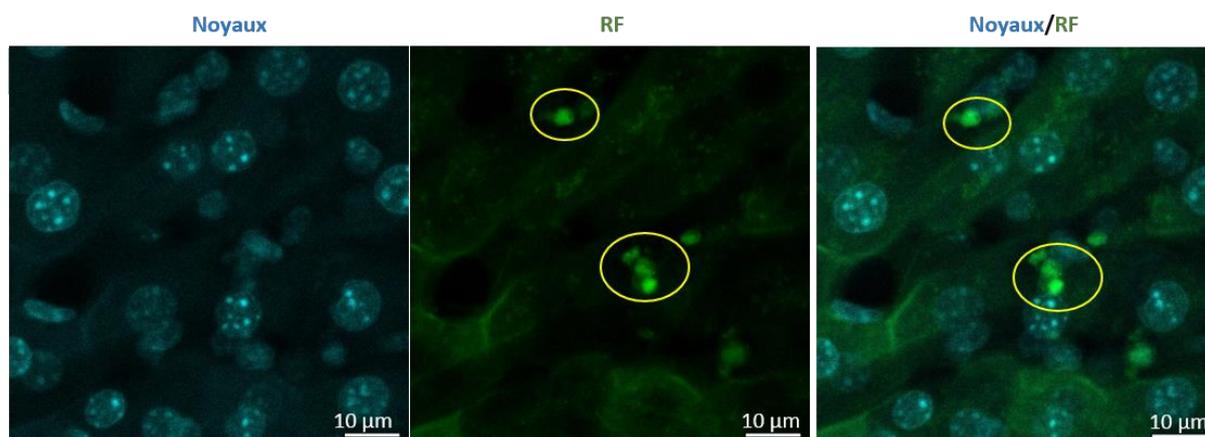


Figure 71 : Observation des gouttelettes de rétinoïdes fluorescentes au niveau péri-sinusoidal sur les coupes de foie de souris SD.

Coupes de foie de souris SD réalisées au vibratome. (Noyaux : cyan, fluorescence des rétinoïdes (RF) : vert). Les cercles jaunes montrent la localisation des gouttelettes fluorescentes des rétinoïdes. Barre d'échelle : 10 μm .

On peut donc supposer que sur un tissu sain, les rétinoïdes sont présents mais répartis dans de nombreuses cellules en quantité non compatible avec une détection sur des coupes fines. De plus, comme décrit précédemment, les HSCs primaires isolées à partir de foie de souris SD présentent bien des gouttelettes de rétinoïdes fluorescentes (Figure 65). Ces gouttelettes sont visibles au microscope optique puisque les cellules sont bien étalées, contrairement à celles présentes sur les coupes hépatiques fines qui sont très aplaties.

4. Identification des cellules hypertrophiées

Les résultats obtenus précédemment nous ont permis d'émettre l'hypothèse que les cellules hypertrophiées, observées sur les coupes hépatiques de souris CDAHFD et contenant des gouttelettes de rétinoides fluorescentes, sont des cellules stellaires hépatiques. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'expression des marqueurs de HSCs par immunohistochimie.

4.1 Expression des marqueurs spécifiques des HSCs

4.1.1 La desmine

Le premier marqueur étudié est la desmine. Cette protéine est un filament intermédiaire exprimé par les HSCs, quel que soit leur état d'activation.

Sur les coupes de foie des souris SD, on observe le signal spécifique des noyaux en bleu et un signal de forme allongée associé au marquage de la desmine (visible en rose) (Figure 72.a). Ces cellules exprimant la desmine sont localisées le long des espaces péri-sinusoïdaux. Sur des coupes hépatiques de souris CDAHFD, on remarque que le signal associé au marquage de la desmine est plus fréquent, confirmant que les cellules exprimant la desmine sont plus nombreuses que sur les coupes hépatiques de souris SD (Figure 72.b). En plus du signal de forme allongée, un signal de forme plus arrondie associé au marquage de la desmine est détecté sur les coupes de foie de souris CDAHFD. En superposant le signal de la desmine et celui de la fluorescence des rétinoides, on observe que ce marquage de forme « arrondie » est colocalisé avec des zones d'accumulation de rétinoides (Figure 72.c). Un zoom sur une zone d'hypertrophie représentative montre que le marquage de la desmine entoure la zone d'accumulation des gouttelettes de rétinoides (Figure 72.d). Cependant, il est difficile de déterminer, avec certitude, si ces fibres de desmine appartiennent à la même cellule contenant les gouttelettes de rétinoides.

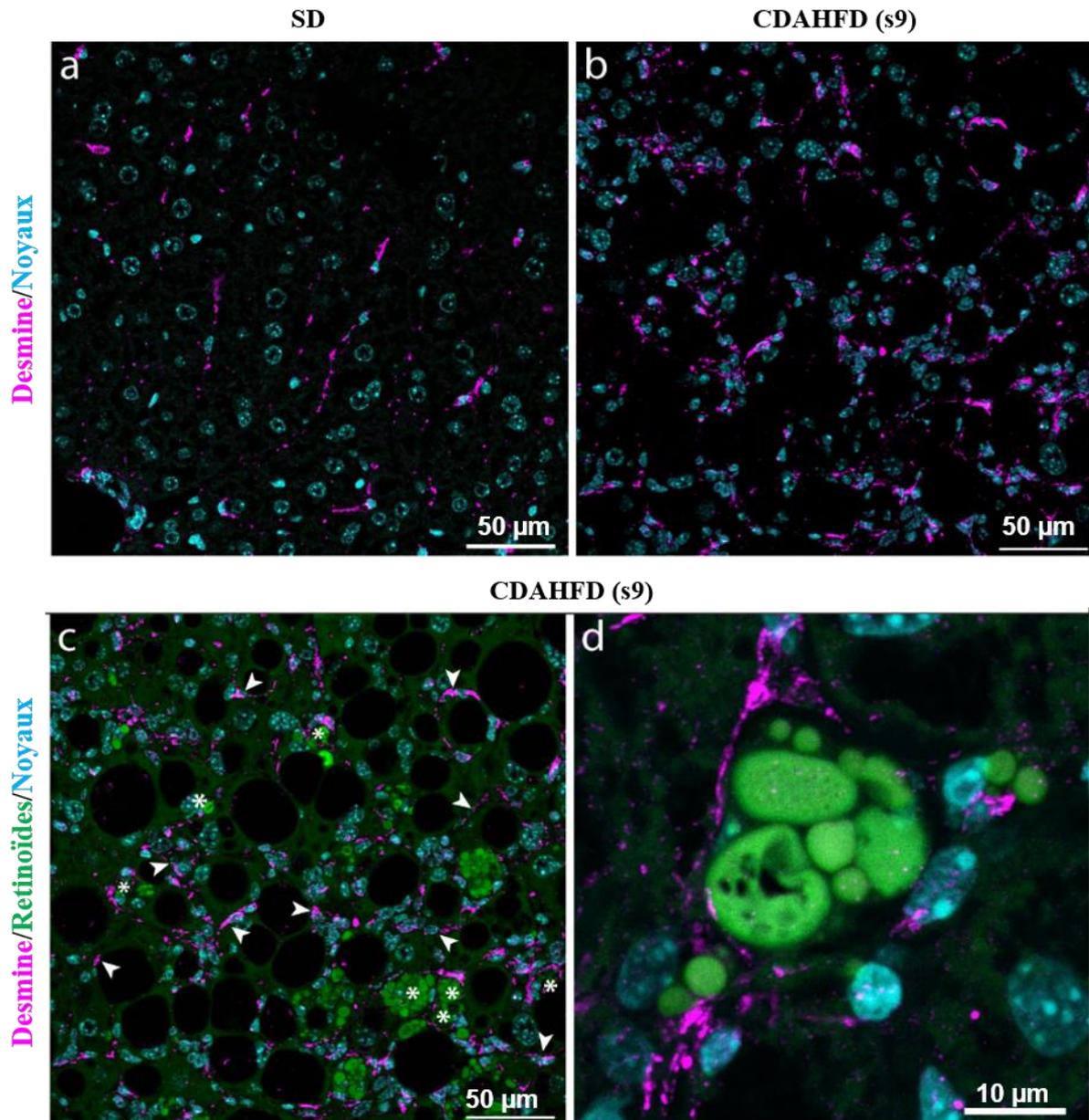


Figure 72 : Expression de la desmine par les HSCs dans les zones d'hypertrophie.

Marquage de la desmine sur des coupes de foie de souris SD (a) et CDAHFD (s9) (b-d). Superposition des signaux DAPI, rétinoïdes et desmine (a, c, d) ou DAPI et desmine (b). Flèches : cellules exprimant la desmine. Étoiles : cellules exprimant la desmine et présentant des gouttelettes de rétinoïdes. Barres d'échelle = 50 µm (a,b,c), 10 µm (d).

Sur l'ensemble des coupes hépatiques de souris CDAHFD, dès la 3^{ème} semaine de régime, la présence de deux populations de cellules présentant un marquage pour la desmine a été identifiée : une population qui présente à la fois un marquage pour la desmine et des gouttelettes fluorescentes de rétinoïdes (étoiles, Figure 72.c), et une autre population qui exprime la desmine mais sans gouttelettes de rétinoïdes (flèches, Figure 72.c).

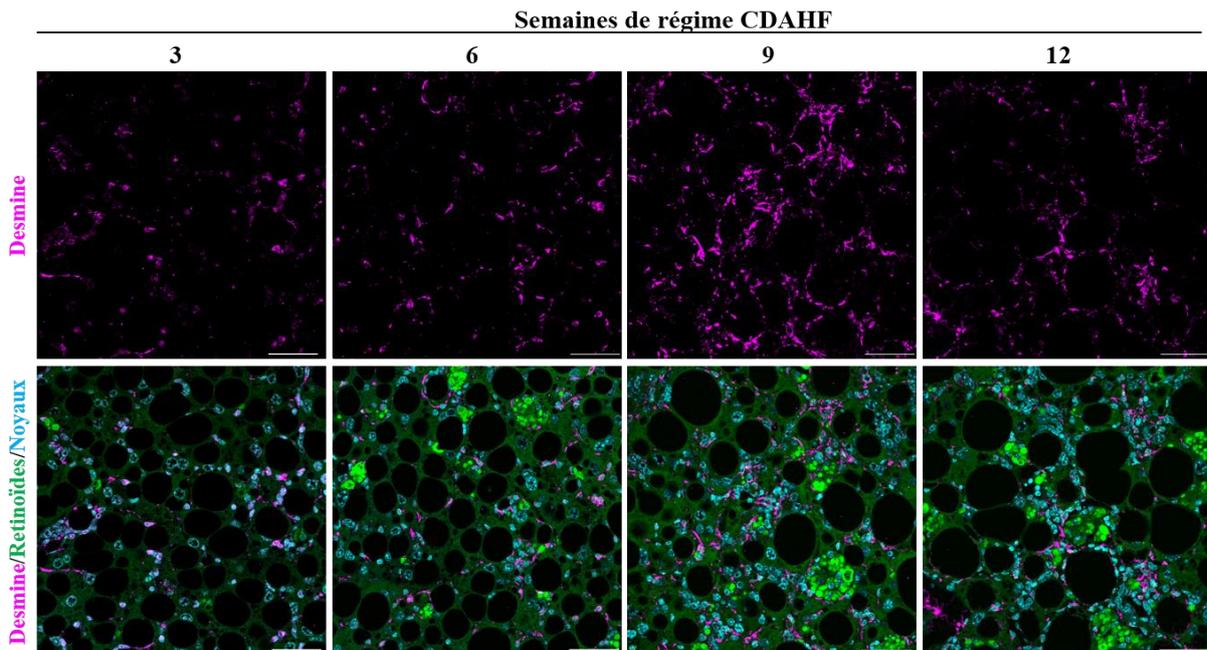


Figure 73 : Cinétique de l'expression de la desmine sur des coupes de foie de souris CDAHFD après 3, 6, 9 et 12 semaines de régime.

Panneau du haut : signal de la desmine. Panneau du bas : superposition des signaux de DAPI, rétinoïdes et desmine. Barres d'échelle = 50 μ m

Comme on peut le voir sur la Figure 73, le signal associé au marquage de la desmine augmente progressivement avec le temps sur les coupes hépatiques de souris CDAHFD. Une quantification, réalisée après 9 et 12 semaines de régime, a montré que 80% des zones d'hypertrophie sont associées à un marquage de la desmine.

4.1.2 Le cRBP1 (cellular Retinol Binding Protein-1)

Le deuxième marqueur étudié est le cRBP1, une protéine impliquée dans le transport de rétinol et fortement exprimée par les HSCs.

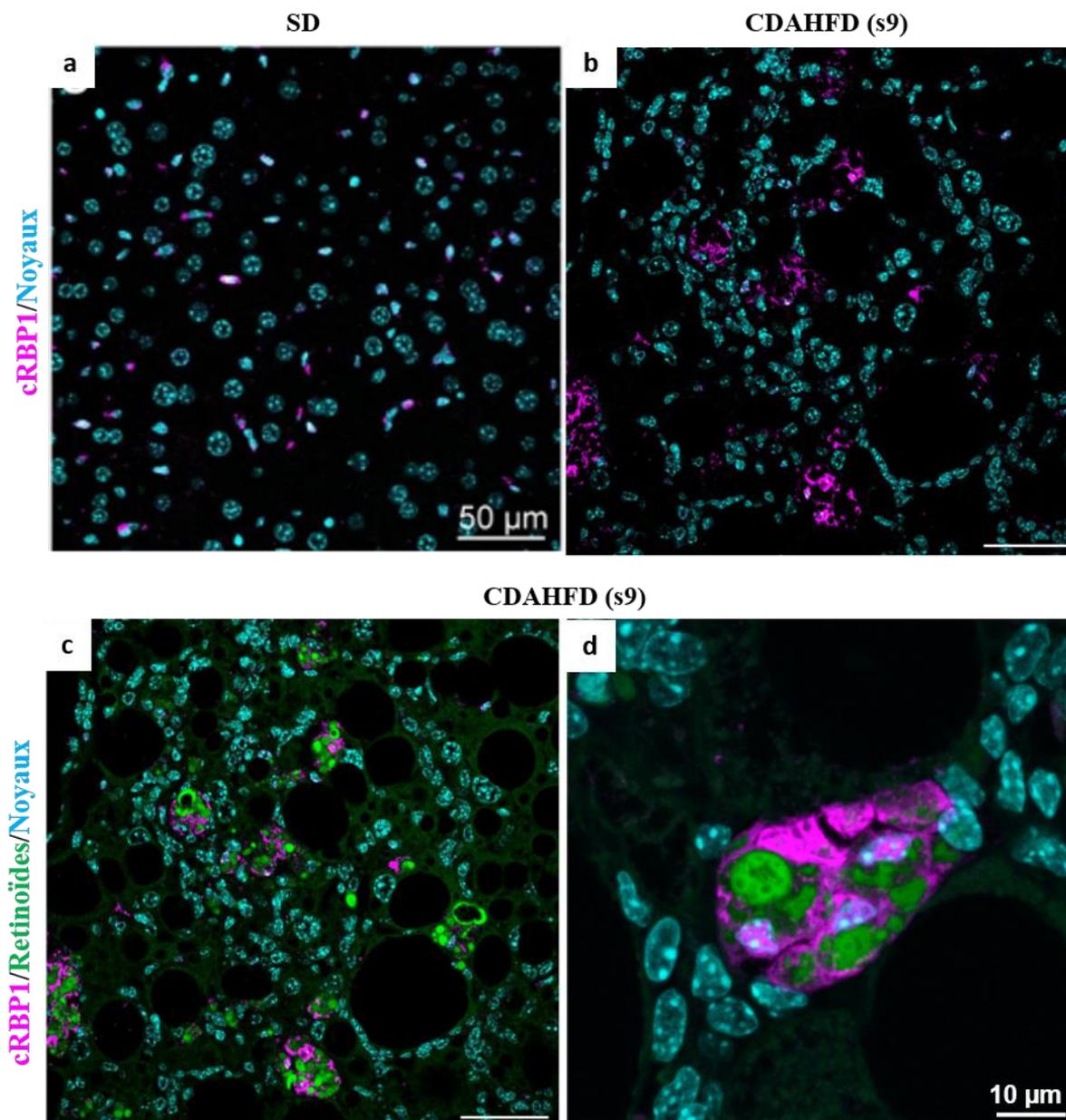


Figure 74 : Expression du cRBP1 par les HSCs dans les zones d'hypertrophie.

Marquage du cRBP1 sur des coupes hépatiques de souris SD (a) et CDAHFD (s9) (b-d). Superposition des signaux DAPI, rétinoides et desmine (a, c, d) ou DAPI et desmine (b). Barres d'échelle = 50 μm, 10 μm (d).

Un signal associé au marquage du cRBP1 est observé sur les cellules situées au niveau de l'espace péri-sinusoidal des coupes hépatiques des souris SD (Figure 74.a). Sur des coupes de foie de souris CDAHFD, on remarque la présence d'un fort signal lié au marquage du cRBP1 (Figure 74.b). La superposition des deux signaux (cRBP1 et rétinoides) permet de mettre en évidence une colocalisation du marquage cRBP1 et des zones d'hypertrophie cellulaire, comme on peut le constater sur la Figure 74.c et d. Un marquage intense du cRBP1 entoure parfaitement les gouttelettes de rétinoides. Après quantification, 91% des amas de cellules hypertrophiées présentent un marquage du cRBP1 (n = 700 zones d'hypertrophie

comptées). Contrairement à ce qui a été observé avec la desmine, aucun marquage de cRBP1 n'est observé sur des cellules dépourvues de gouttelettes de rétinoïdes.

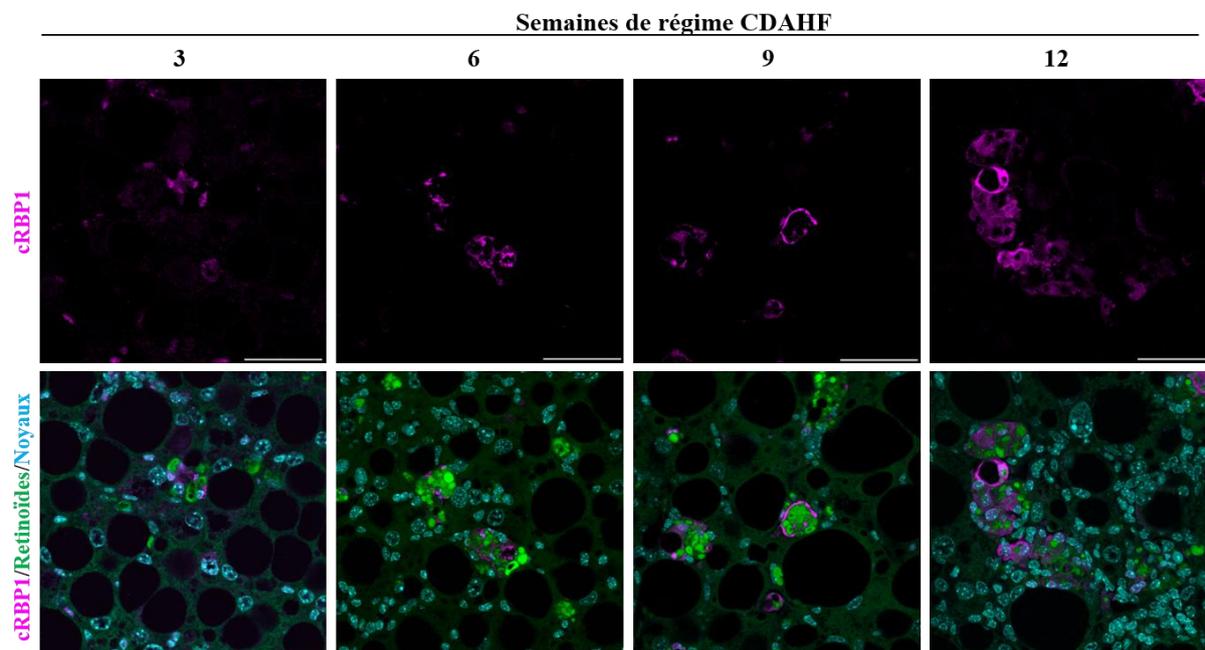


Figure 75 : Cinétique de l'expression du cRBP1 sur des coupes hépatiques de souris CDAHFD après 3, 6, 9 et 12 semaines de régime.

Panneau du haut : signal du cRBP1. Panneau du bas : superposition des signaux de DAPI, rétinoïdes et cRBP1. Barres d'échelle = 50 μ m.

La Figure 75 montre que le marquage du cRBP1 augmente progressivement avec le temps sur les coupes hépatiques de souris CDAHFD. Une augmentation de l'expression hépatique du cRBP1 a également été décrite dans un modèle de rat MCD (Miyazaki et al., 2014). La majorité des cellules exprimant le cRBP1 présente une accumulation de gouttelettes de rétinoïdes.

En résumé, sur les coupes de foie des souris SD, nous avons observé la présence de cellules péri-sinusoïdales présentant à la fois un marquage pour la desmine et le cRBP1, tous deux caractéristiques des HSCs. Sur les coupes hépatiques des souris CDAHFD, deux types de cellules ont été mises en évidence : i) des cellules péri-sinusoïdales exprimant la desmine sans signal de rétinoïdes ; ii) et des cellules dans les zones d'hypertrophie montrant à la fois une accumulation des gouttelettes de rétinoïdes et les marquages de la desmine et du cRBP1. Par conséquent, les cellules hypertrophiées, contenant les gouttelettes de rétinoïdes et présentes dans ces zones spécifiques, correspondent à des cellules stellaires hépatiques.

4.2 Etude de l'état d'activation et de prolifération des HSCs

4.2.1 L'actine α du muscle lisse (α -SMA)

La distribution des marqueurs de l'activation des HSCs sur les coupes de foie de souris CDAHFD et SD a ensuite été étudiée. L'actine α du muscle lisse (α -SMA) est un marqueur de fibrose et est exprimé par les myofibroblastes issues de la dédifférenciation des HSCs activées.

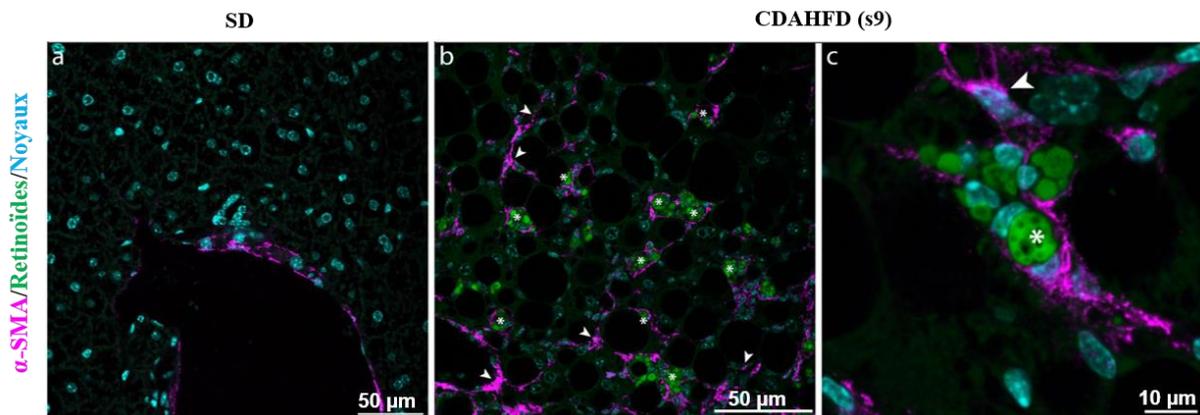


Figure 76 : Expression du α -SMA par les HSCs dans les zones d'hypertrophie.

Marquage du α -SMA sur des coupes de foie de souris SD (a) et CDAHFD (s9) (b-c). Superposition des signaux DAPI, rétinoïdes et α -SMA. Barres d'échelle = 50 μ m, 10 μ m (d).

Sur les coupes hépatiques de souris SD, le signal associé au marquage du α -SMA est détecté uniquement autour des veines (Figure 76.a), tandis que sur les coupes de foie des souris CDAHFD, un marquage significatif du α -SMA est détecté dans l'ensemble du parenchyme hépatique, en plus des vaisseaux (Figure 76.b). De plus, comme cela a été observé pour la desmine, une colocalisation entre le marquage du α -SMA et le signal des rétinoïdes est retrouvée dans certaines zones d'hypertrophie (étoiles, Figure 76.b et c). Un zoom sur une zone d'hypertrophie représentative montre que le signal du α -SMA entoure parfaitement les gouttelettes de rétinoïdes (étoile, Figure 76.c). Cependant, certaines cellules exprimant le α -SMA sont dépourvues de signal de rétinoïdes (flèches, Figure 76.c).

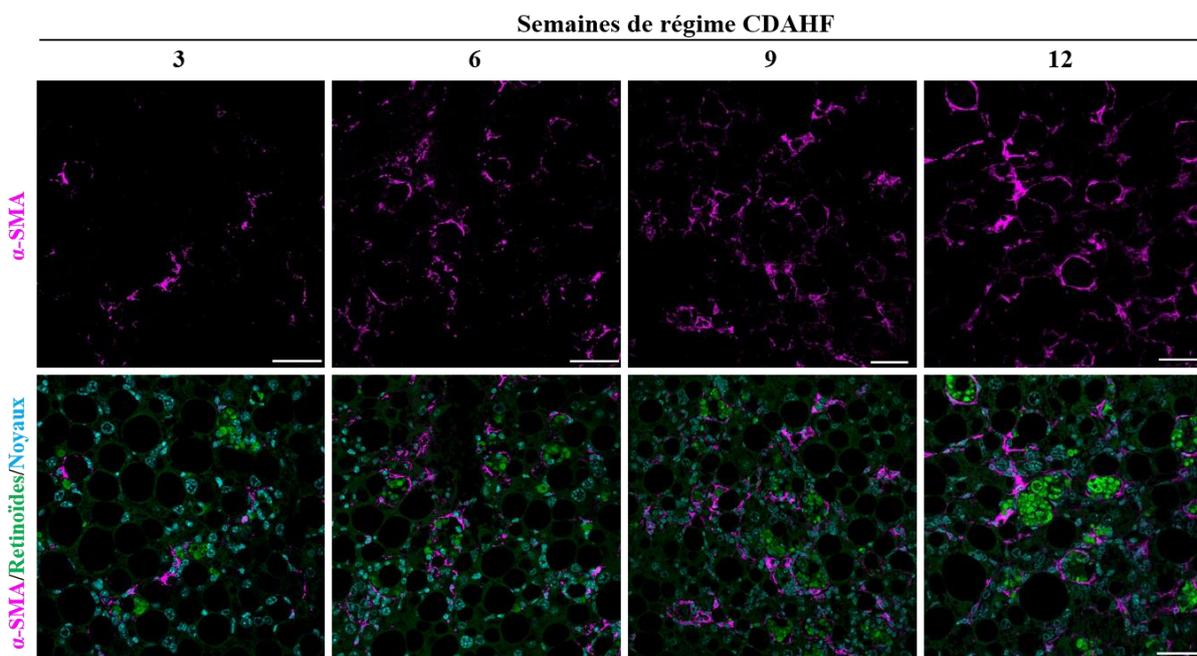


Figure 77 : Cinétique de l'expression du α -SMA sur des coupes de foie de souris CDAHFD après 3, 6, 9 et 12 semaines de régime.

Panneau du haut : signal du α -SMA. Panneau du bas : superposition des signaux de DAPI, rétinoïdes et α -SMA. Barres d'échelle = 50 μ m.

Le signal associé au marquage du α -SMA est observé dans le parenchyme hépatique des souris CDAHFD à partir de la 3^{ème} semaine de régime et augmente progressivement jusqu'à la 12^{ème} semaine, comme le montre la Figure 77. Après quantification, 92,5% des cellules hypertrophiées sont entourées par le marquage du α -SMA à la 12^{ème} semaine de régime CDAHFD (n> 200 événements).

Cependant, comme les cellules hépatiques des souris CDAHFD présentent une organisation différente d'un tissu hépatique sain, il est difficile de déterminer avec certitude, sur les coupes de foie immunomarquées, si les cellules stellaires hypertrophiées expriment bien le α -SMA ou s'il est exprimé par une cellule adjacente qui ne contient pas de gouttelettes de rétinoïdes. Afin de trancher entre ces deux hypothèses, un Z-stack du marquage associé au α -SMA et une analyse en transversal ont été réalisés. Comme on peut le voir sur la Figure 78, la cellule stellaire hypertrophiée étudiée présente un signal associé au marquage du α -SMA qui entoure les gouttelettes fluorescentes de rétinoïdes. On observe également le noyau de la cellule marqué au DAPI entre les gouttelettes de rétinoïdes fluorescentes. La vue orthogonale permet également de confirmer que le signal du α -SMA est effectivement présent dans la cellule stellaire hypertrophiée contenant les gouttelettes fluorescentes de rétinoïdes.

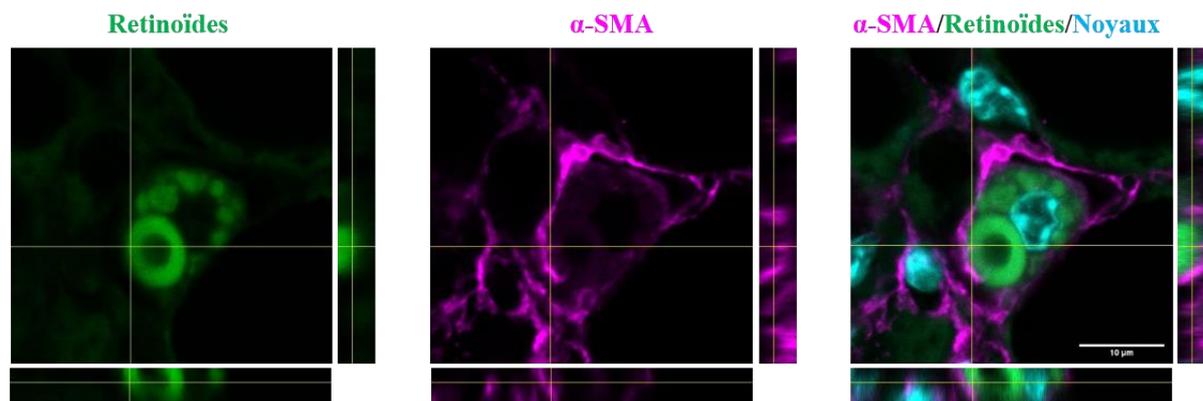


Figure 78 : Colocalisation du α -SMA et des gouttelettes de rétinoides dans une cellule stellaire hypertrophiée sur une coupe de foie de souris CDAHFD.

Le Z-stack de l'immuno-marquage du α -SMA, sur une coupe de foie de souris CDAHFD, a permis l'imagerie tridimensionnelle d'une HSC hypertrophiée et a mis en évidence la colocalisation des gouttelettes de rétinoides fluorescente (à gauche), et α -SMA (milieu). Superposition des signaux DAPI, rétinoides et α -SMA (à droite). Panneau droit et panneau inférieur pour chacun : vue orthogonale de 4,3 μ m de largeur du Z-stack le long des lignes jaunes. Barre d'échelle : 10 μ m.

4.2.2 Le Ki67

Afin de caractériser qualitativement, l'état de prolifération des cellules hypertrophiées, un immunomarquage du Ki67 a été réalisé. Quelques rares noyaux exprimant le Ki67 sont observés sur les coupes de foie des souris SD (Figure 79.a). Sur les coupes hépatiques des souris CDAHFD, le signal associé au marquage du Ki67 est beaucoup plus fréquent. Des cellules en prolifération sont observées à la fois dans le parenchyme hépatique et dans les zones d'hypertrophie cellulaire, démontrant l'état régénératif du foie dans le modèle CDAHFD (Figure 79.b). La Figure 79.c montre un exemple de division cellulaire observée dans une zone d'hypertrophie, entourée par des gouttelettes de rétinoides. Cependant, les cellules exprimant le Ki67 sont moins fréquentes dans les zones d'hypertrophie que dans le parenchyme hépatique, représentant seulement 14% des cellules marquées à 9 et 12 semaines de régime CDAHFD.

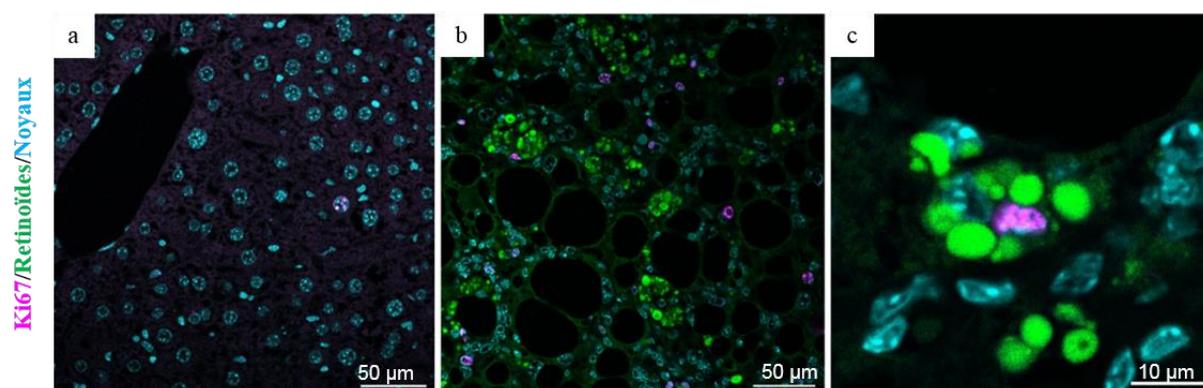
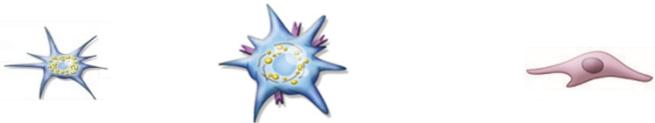


Figure 79 : Etat de prolifération des cellules dans les zones d'hypertrophie.

Marquage du Ki67 sur des coupes de foie de souris SD (a) et CDAHFD (b, c). Superposition des signaux DAPI, rétinoides et Ki67. Barre d'échelle : 50 μ m (a, b), 10 μ m (c).

Les expériences d'immunohistochimie ont permis de mettre en évidence, sur les coupes hépatiques des souris CDAHFD, la coexistence de deux populations de cellules stellaires : i) une population de HSCs dépourvues de gouttelettes de rétinoides exprimant la desmine et le α -SMA, correspondant à la population attendue de HSCs activées ; ii) et une deuxième population non attendue, donc nouvelle, de cellules hypertrophiées présentant à la fois les caractéristiques de HSCs quiescentes, en l'occurrence, la capacité à stocker les rétinoides, l'expression de la desmine et du cRBP1, et les caractéristiques de HSCs activées puisqu'elles expriment le α -SMA, et certaines sont en prolifération (Figure 80).



	HSC quiescente	HSC hypertrophiée	HSC activée (myofibroblaste)
Desmine	+	+	+
Rétinoïdes	+	++	-
cRBP1	+	+	-
α -SMA	-	+	+

Figure 80 : Marqueurs de cellules stellaires selon leur état d'activation.

Les HSCs quiescentes expriment la desmine, le cRBP1, et possèdent des gouttelettes de rétinoides. Les HSCs activées conservent l'expression de la desmine mais pas du cRBP1, elles sont dépourvues de gouttelettes de rétinoides et expriment le α -SMA. Les HSCs hypertrophiées identifiées dans le modèle CDAHFD expriment les marqueurs à la fois de HSCs quiescentes (desmine, cRBP1 et rétinoides) et des HSCs activées (α -SMA).

À notre connaissance, ce phénotype de cellules stellaires, présentant un nombre exacerbé de gouttelettes de rétinoides, n'a jamais été décrit dans un contexte de fibrose hépatique, ni dans la fibrose humaine ni dans des modèles animaux de fibrose.

5. Caractérisation de la fibrose et des accumulations de rétinoides par microscopie multi-photonique

Les résultats décrits précédemment ont montré que l'hypertrophie des cellules stellaires, observée sur les coupes de foie des souris CDAHFD, est localisée à proximité des dépôts de collagène et suit la même cinétique d'apparition et de progression que celle de la fibrose. Afin de caractériser simultanément l'accumulation de rétinoides et le dépôt de fibres de collagène, nous avons réalisé une analyse par microscopie multi-photonique.

5.1 Intérêt de la microscopie multi-photonique

Cette technique de microscopie optique non linéaire permet de visualiser le collagène fibrillaire par génération de seconde harmonique (SHG), sans nécessiter de marquage exogène. C'est le domaine en triple hélice du collagène qui semble être responsable de l'émission de ce signal. Il est ainsi possible de détecter, sur la même coupe de foie, sur le même champ et sans réaliser de traitement particulier, à la fois le signal de fluorescence des rétinoïdes et le signal spécifique des fibres de collagène. De plus, la microscopie multi-photonique est une technique robuste pour la quantification de la surface occupée par les fibres de collagène. En effet, le signal obtenu par SHG est très spécifique du collagène fibrillaire, aucun autre signal n'est donc observé sur la coupe, contrairement aux coupes colorées au Sirius Red qui présentent un bruit de fond lié à la technique de coloration histologique qui pourrait induire d'importantes variabilités de quantification. La fluorescence des rétinoïdes est par la suite appelée RF (*retinoid fluorescence*) et le signal spécifique des fibres de collagène (CF) obtenu par génération de seconde harmonique (SHG), est appelé CF/SHG.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence la colocalisation des fibres de collagènes et des cellules hypertrophiées sur des coupes de foie de souris CDAHFD. Ainsi, au niveau des zones d'accumulation du signal lié à la fluorescence des rétinoïdes (RF, en vert), un signal spécifique des fibres de collagène (CF/SHG, en blanc) est également observé (Figure 81). La superposition des deux images permet de mettre en évidence la colocalisation des deux signaux (RF et CF/SHG) et on observe que les fibres de collagène entourent étroitement les gouttelettes de rétinoïdes (Figure 81, image superposée).

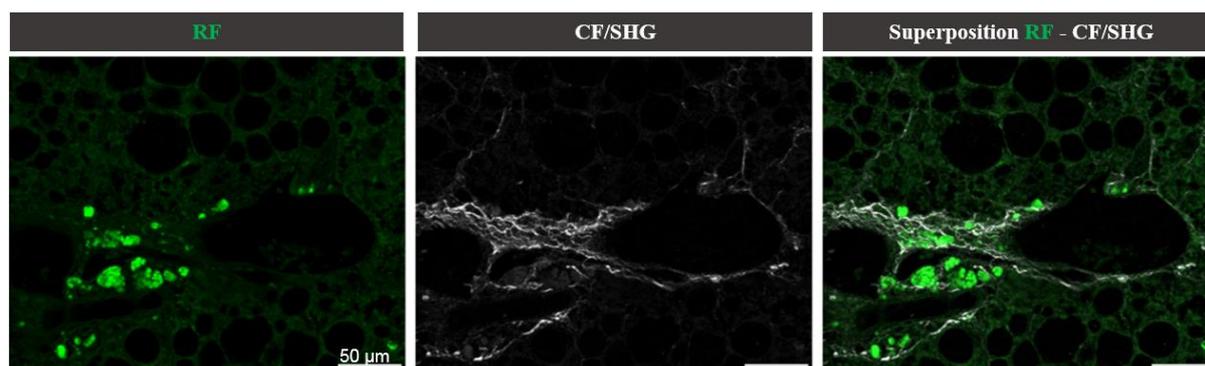


Figure 81 : Colocalisation des gouttelettes de rétinoïdes et des fibres de collagène sur les coupes de foie de souris CDAHFD

Exemple de colocalisation de la fluorescence des rétinoïdes (RF) imagée par microscopie à fluorescence (à gauche) et des fibres de collagène imagée par génération de seconde harmonique (CF / SHG) (milieu). À droite : la superposition des signaux RF et CF / SHG. Barre d'échelle : 50 µm.

5.2 Etude spatio-temporelle

5.2.1 Conception de la méthode

Dans un second temps, la répartition spatio-temporelle des rétinoides et du collagène a été étudiée. Pour cela des coupes hépatiques de souris CDAHFD et SD, de 3 à 22 semaines de régime, ont été entièrement scannées par microscopie multi-photonique, en fluorescence pour détecter le signal RF et en génération de seconde harmonique pour le signal CF/SHG. Afin de reconstituer l'image de la coupe entière, la mosaïque constituée de la série d'images microscopiques réalisées a été reconstruite, comme cela est décrit dans la Figure 82. Ainsi, pour chaque souris, l'image de la coupe hépatique entière a été obtenue, permettant d'analyser la distribution spatiale des deux signaux RF et CF/SHG dans le tissu hépatique, en fonction de la durée du régime.

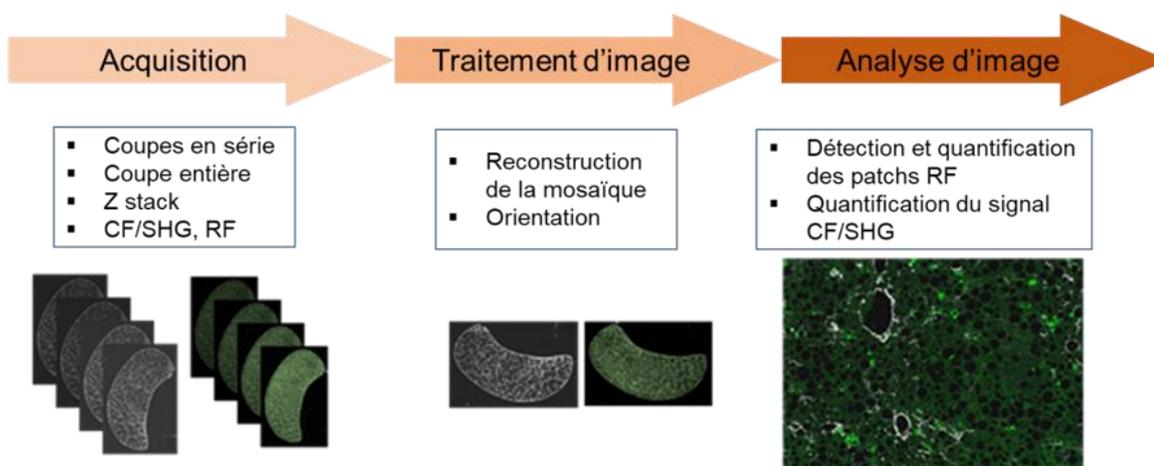


Figure 82 : Méthode d'analyse des coupes de foie de souris CDAHFD par microscopie multi-photonique.

La première étape correspond à l'acquisition de signaux et d'images de fluorescence de rétinoides (RF) et de seconde harmonique (CF/SHG) de toute la coupe de foie. Le prétraitement est une étape automatisée qui permet la reconstruction de l'image de la coupe en réalisant une mosaïque. Les images des signaux CF/SHG et RF sont réorientées et alignées pour l'analyse de la colocalisation. L'analyse d'image permet la quantification des signaux RF et CF/SHG.

Par la suite, nous avons quantifié la surface occupée par les dépôts des fibres de collagène et les accumulations de rétinoides sur la même coupe hépatique. Pour cela, l'analyse des images a été réalisée via une macro développée sous Fiji et permettant la quantification des signaux RF et CF/SHG. L'algorithme traitant le signal RF permet d'individualiser chaque zone présentant un signal RF en « patches » dans le but de déterminer le nombre de patches RF par unité de surface ou densité RF. Ces patches RF sont de taille variable car ils peuvent correspondre à une seule gouttelette de rétinoides, plusieurs gouttelettes indiscernables au sein d'une même cellule, ou un cluster de cellules chargées de gouttelettes. Les méthodes d'acquisition, d'analyse et de quantification ont été développées et mises au point

spécifiquement par nos collaborateurs de l'Unité de Technologie et de Service « Bioimagerie photonique » de l'Institut Pasteur, le Dr. Anne Danckaert et le Dr. Julien Fernandes.

5.2.2 Répartition spatiale

Une fois les mosaïques des coupes hépatiques de souris CDAHFD reconstruites (un exemple est illustré dans la Figure 83), une analyse de la distribution spatiale des deux signaux est réalisée. On observe que le signal des fibres de collagène est principalement concentré au niveau des zones centro-lobulaires, ce qui correspond à une fibrose péri-sinusoïdale marquée. Ces fibres de collagène sont associées aux accumulations de rétinoïdes qui sont également concentrés autour des veines centro-lobulaires, sans envahir les zones péri-portales (Figure 83.A). La quantification de la densité des patchs RF nous a permis d'obtenir une cartographie de la densité du signal RF. La Figure 83.B montre que la densité des patchs RF est plus élevée au niveau des veines centro-lobulaires (CV) qu'au niveau des veines portes (PV).

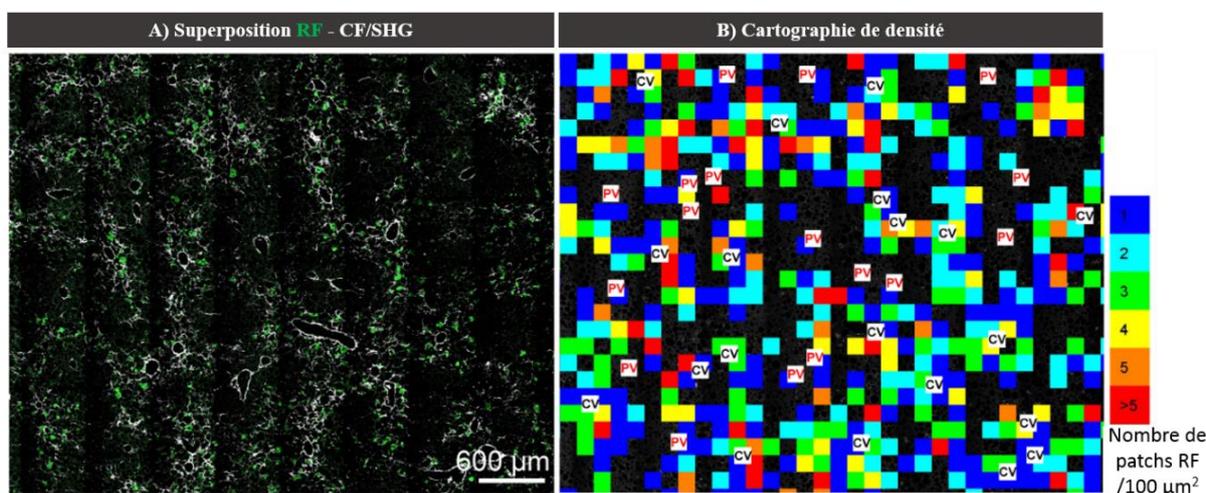


Figure 83 : Analyse de la répartition spatiale du signal CF/SHG et du signal RF sur une coupe de foie de souris CDAHFD par microscopie multi-photonique.

A) Un exemple de coupe de foie de souris CDAHFD, après 9 semaines de régime, analysée par microscopie multi-photonique pour les signaux RF et CF / SHG après reconstruction de l'image de la coupe. Barre d'échelle : 600 μm. B) Cartographie de la densité des patchs RF de la même coupe de foie (droite).

5.2.3 Répartition temporelle

La cinétique d'accumulation des rétinoïdes et des fibres de collagène a ensuite été étudiée, en analysant les coupes de foie des souris CDAHFD, à différents temps de régime (3, 6, 9, 12, 22 semaines). On observe sur la Figure 84 que le signal des fibres de collagène est de plus en plus abondant et que la fréquence du signal RF augmente progressivement en fonction du temps de régime. La superposition des deux images (RF et CF/SHG) montre que les deux signaux évoluent de manière concomitante tout au long de l'administration du régime CDAHFD, ce qui est cohérent avec ce qui a été observé sur les coupes de foie après colorations histologiques.

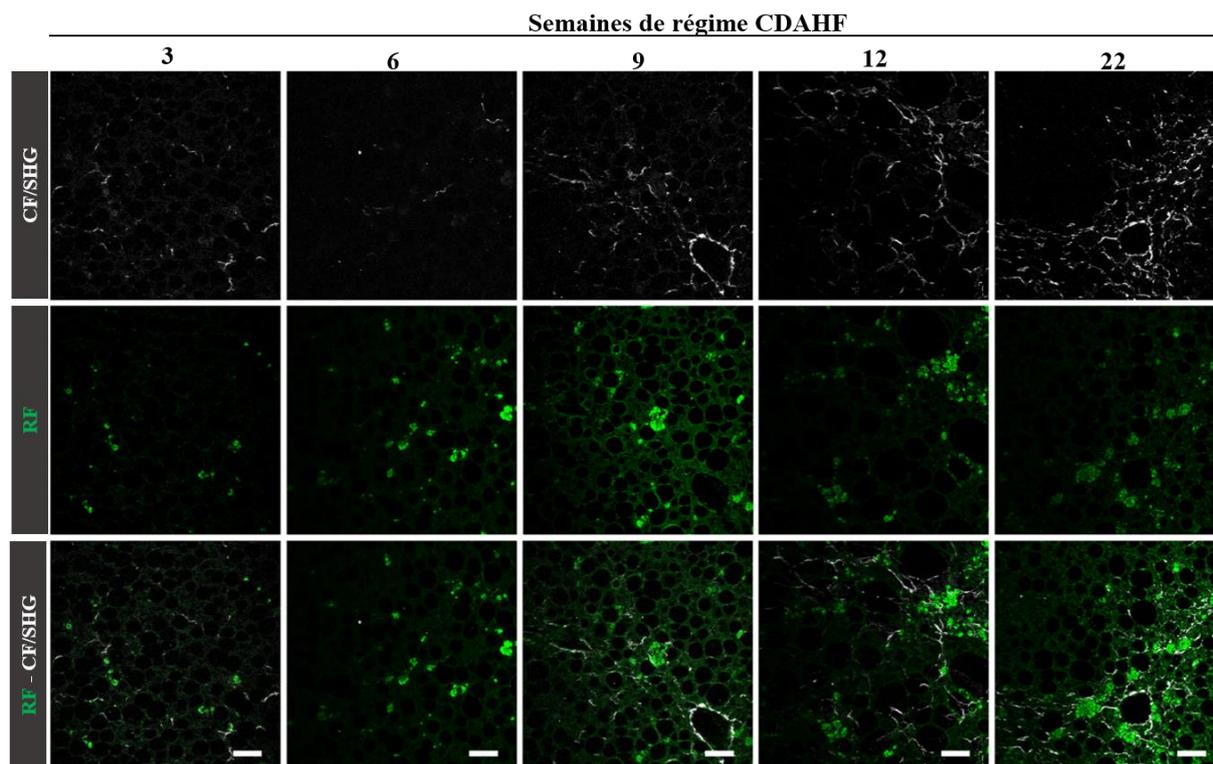


Figure 84 : Cinétique du collagène et des rétinoides sur les coupes de foie des souris CDAHFD.

Signal du collagène (CF / SHG - panneau supérieur) et des rétinoides (RF - panneau du milieu) sur des coupes de foie de souris CDAHFD après 3, 6, 9, 12 et 22 semaines de régime. Le panneau inférieur est une superposition des deux signaux précédents. Barre d'échelle : 50 μ m.

Ces résultats ont donc permis de mettre en évidence une localisation proche ainsi qu'une progression simultanée des fibres de collagène et des accumulations de rétinoides. Les deux signaux suivent donc la même cinétique spatio-temporelle

5.2.4 Quantification des signaux de rétinoides et des fibres de collagène

Une quantification de la surface occupée par les deux signaux a ensuite été réalisée comme décrit précédemment. La Figure 85.A représente le pourcentage de la surface de la coupe occupée par les patches de RF, en fonction du temps de régime. Ainsi, aucun signal RF n'est observé sur les coupes de foie de souris SD (et ce quel que soit le temps). A la 3^{ème} semaine de régime CDAHFD, la surface de la coupe hépatique occupée par le signal RF est très faible (0,04%). A partir de la 6^{ème} semaine de régime, ce signal est plus élevé sur les coupes de foie de souris CDAHFD et occupe environ 0,3% de la surface de la coupe hépatique entière. Ce pourcentage augmente progressivement pour atteindre environ 1,6 % de la surface totale de la coupe, avec une variabilité de 0,5% à la 12^{ème} semaine de régime. Ce pourcentage est maintenu jusqu'à la fin de l'expérimentation (1,17% à la 22^{ème} semaine).

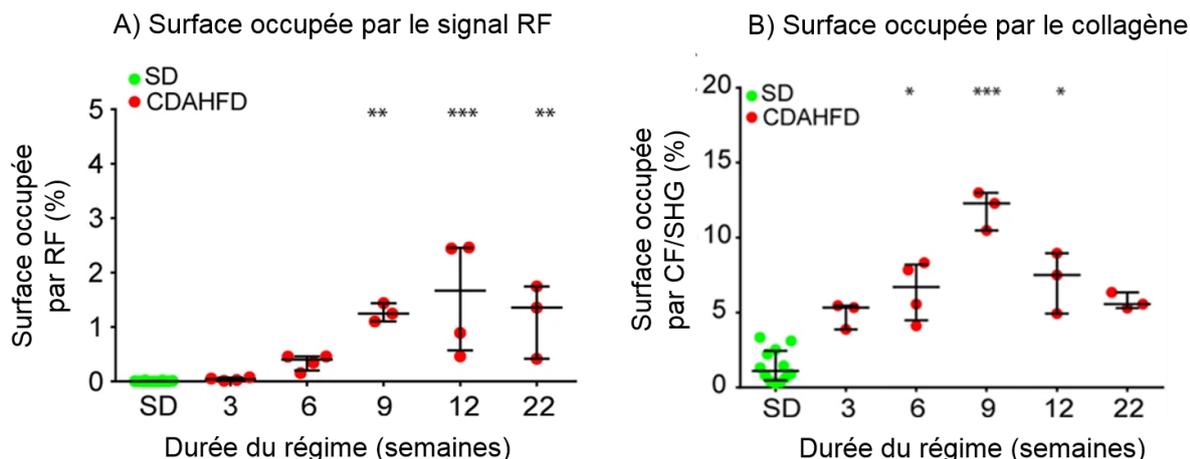


Figure 85 : Quantification du signal de fluorescence des rétinoides (RF) et des fibres de collagène (CF / SHG).

A) Pourcentage de la surface occupée par le signal RF sur les coupes totales de foie de souris SD et CDAHFD en fonction du temps. (B) Pourcentage de la surface occupée par le signal CF / SHG sur les coupes totales de foie de souris SD ou CDAHFD en fonction du temps. Statistiques : n = 3-12 pour chaque groupe, médiane avec l'intervalle interquartile, test de Kruskal Wallis. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001.

De même, le pourcentage de la surface de la coupe occupée par les fibres de collagène a été quantifié. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 85.B. Un signal de base de CF/SHG (médiane = 1,11% de la surface totale de la coupe) est observé sur les coupes de foie de souris SD. Ce signal correspond au collagène fibrillaire présent de manière physiologique dans le foie, autour des veines et des artères. Sur les coupes de foie des souris CDAHFD, la surface occupée par les fibres de collagène est d'environ 5% (médiane = 5,3%) de la surface totale, à la 3^{ème} semaine de régime. Ce signal augmente progressivement, jusqu'à atteindre une médiane de 12,3% de la surface totale de la coupe, à la 9^{ème} semaine de régime. Une diminution de la surface de la coupe occupée par les fibres de collagène est détectée à la 22^{ème} semaine de régime (médiane = 5,5%), qui pourrait être expliquée par la formation des nodules dans le foie des souris CDAHFD. Cette quantification des deux signaux (RF et CF/SHG) est en cohérence avec l'analyse de la répartition spatio-temporelle des rétinoides et des fibres de collagène, réalisée sur les coupes de foie des souris CDAHFD, démontrant une évolution concomitante des deux cinétiques.

Pour conclure, la combinaison de la microscopie à fluorescence et la génération de seconde harmonique a permis de montrer que l'accumulation des gouttelettes de rétinoides est toujours associée aux dépôts des fibres de collagène et que les deux phénomènes suivent la même cinétique spatio-temporelle. En effet, en ce qui concerne la localisation, les deux signaux sont principalement concentrés au niveau péri-sinusoïdal et en termes de cinétique, les deux évoluent de manière concomitante tout au long de l'administration du régime CDAHFD. Cette étude simultanée de la distribution des deux signaux sur la même coupe n'est pas réalisable sur les coupes histologiques colorées.

L'analyse des images obtenues par microscopie multi-photonique a permis la quantification de la surface occupée par les signaux (RF et CF/SHG) et a confirmé cette progression simultanée de l'hypertrophie des HSCs et de la fibrose. Cela nous amène à supposer que ce phénomène d'hypertrophie des HSCs est étroitement lié à la fibrose hépatique, et à s'interroger sur sa présence dans d'autres modèles animaux.

6. Mise en évidence de l'hypertrophie des HSCs dans d'autres modèles de maladies hépatiques

6.1 Caractérisation de la fibrose sur d'autres modèles murins de maladies hépatiques métaboliques

Afin de déterminer si la présence de cellules stellaires hypertrophiées est une caractéristique du modèle CDAHFD ou non, nous nous sommes tournés vers d'autres modèles de maladies hépatiques métaboliques. Pour cela, des souris ont été soumises à deux régimes alimentaires différents, le régime déficient en méthionine et en choline (MCD) pendant 9 semaines ou le régime riche en graisses et en glucides (HFHC) pendant 16 semaines, ce qui était, d'après la littérature, les durées maximales pour obtenir une fibrose péri-sinusoïdale. Dans un premier temps avant de rechercher la présence potentielle de HSCs hypertrophiées, nous avons caractérisé l'établissement de la fibrose dans les deux modèles.

6.1.1 Le modèle déficient en méthionine et en choline (MCD)

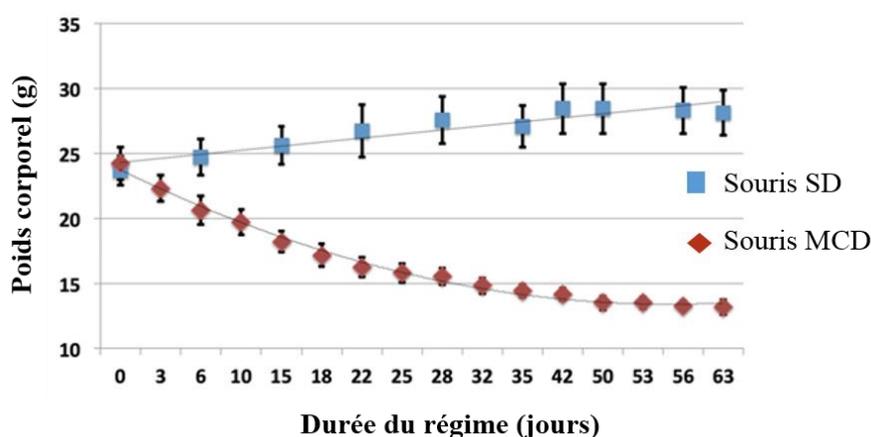


Figure 86 : Suivi du poids corporel des souris MCD et SD en fonction du temps. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

Comme pour le modèle CDAHFD, les souris MCD ont été pesées régulièrement (deux fois par semaine). La Figure 86 illustre l'évolution du poids corporel moyen des deux groupes de souris

(MCD et SD) en fonction du temps. Au début de l'expérimentation, les souris présentent un poids corporel moyen autour de 23 g. Après 9 semaines de régime, une légère augmentation du poids est observée chez les souris SD, pour atteindre environ 28 g, tandis que dans le groupe de souris MCD, une diminution importante du poids corporel est observée, pour atteindre un poids moyen de 13 g à la fin de l'expérimentation (Figure 86). Cela représente une diminution d'environ 46% du poids moyen des souris MCD par rapport aux souris SD.

L'étude histologique à la 9^{ème} semaine de régime des coupes H&E de foie de souris MCD permet de mettre en évidence la présence d'une stéatose hépatique à la fois micro-vésiculaire et macro-vésiculaire (Figure 87.A). Cette stéatose est au stade 3 pour la plupart des souris (5/6) (Figure 87.C). Contrairement au modèle CDAHFD, la ballonnisation des hépatocytes est plus fréquente dans le foie des souris MCD, la plupart des souris sont au stade 1 de ballonnisation hépatocellulaire (Figure 87.C). Les souris MCD présentent également une inflammation avec 3/6 souris qui sont au stade 3, 2/6 au stade 2 et une souris au stade 1 à la 9^{ème} semaine de régime (Figure 87.C). Une légère fibrose péri-sinusoïdale, qui correspond au stade 1a de fibrose, est observée chez seulement 2/6 souris (Figure 87.B), tandis qu'aucune fibrose n'est détectée chez les autres souris (4/6) à la 9^{ème} semaine de régime (Figure 87.C).

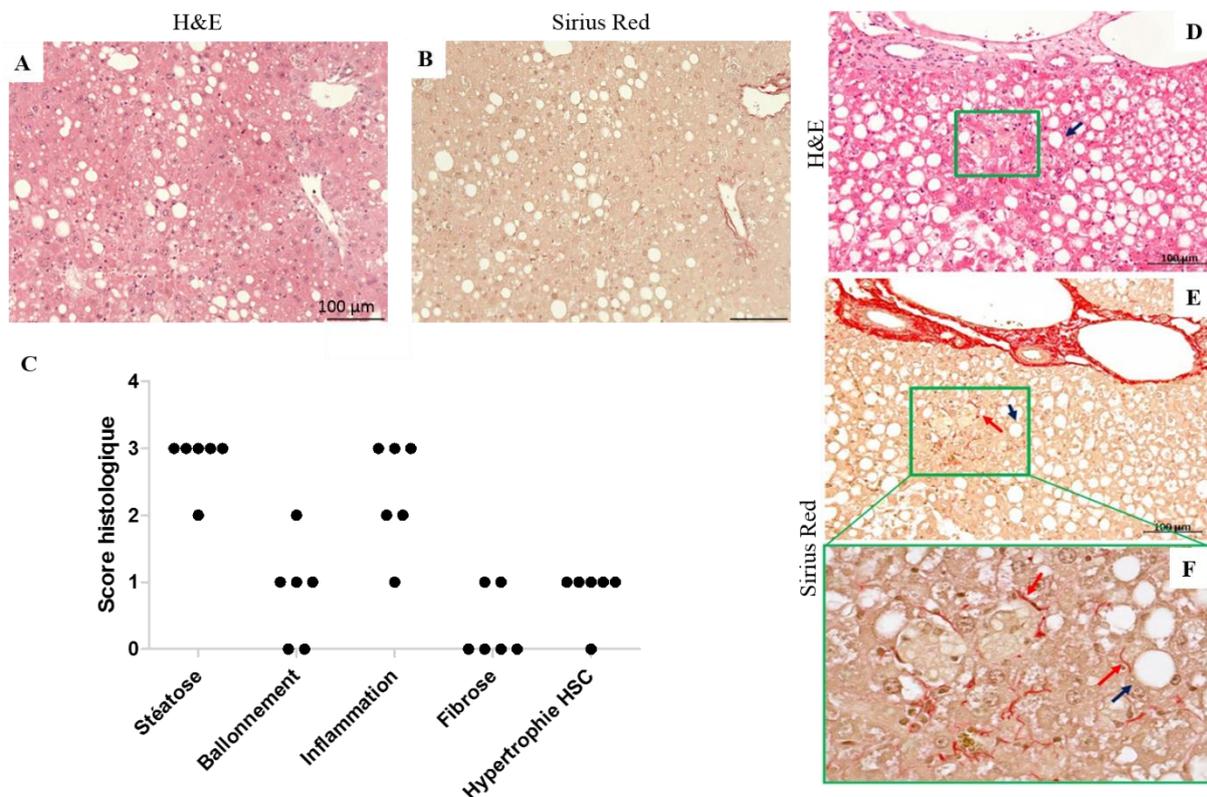


Figure 87 : Analyse histologique et mise en évidence de l'hypertrophie des HSCs dans le modèle MCD. Coupes de foie de souris MCD, après 9 semaines de régime, colorées à l'Hématoxyline et l'Eosine (A, D) et au Sirius Red (B, E, F). Flèche noire : vacuole lipidique, flèche rouge : fibres de collagène. C) Scores histologiques de stéatose, de ballonnisation hépatocellulaire, d'inflammation, de fibrose et d'hypertrophie de HSCs après 9 semaines de régime MCD. Barre d'échelle : 100 µm.

Sur les coupes H&E de foie de souris MCD après 9 semaines de régime, nous avons observé la présence de cellules stellaires hypertrophiées qui apparaissent en jaune (Figure 87.D). En analysant les coupes adjacentes colorées au Sirius Red, on constate que, comme cela avait été observé sur le modèle CDAHFD, les fibres de collagènes, colorées en rouge, entourent les cellules hypertrophiées (Figure 87.E, F). Cette forme modérée d'hypertrophie de HSCs, correspondant au stade 1 du score établi pour l'hypertrophie, a été observée chez la majorité des souris MCD (5/6) (Figure 87.C).

6.1.2 Le modèle de type «western diet» (High Fat High Carbohyrate, HFHC)

Le poids des souris soumises au régime HFHC a été suivi en fonction du temps. La Figure 88 montre l'évolution du poids corporel moyen des souris au cours de l'administration du régime HFHC. Au début de l'expérimentation, toutes les souris présentent un poids corporel moyen autour de 23 g. Après 16 semaines, le poids des souris SD a légèrement augmenté pour atteindre 32 g tandis que celui des souris HFHC a doublé et a atteint 50 g. Cela représente une augmentation d'environ 56% du poids moyen des souris HFHC par rapport aux souris SD.

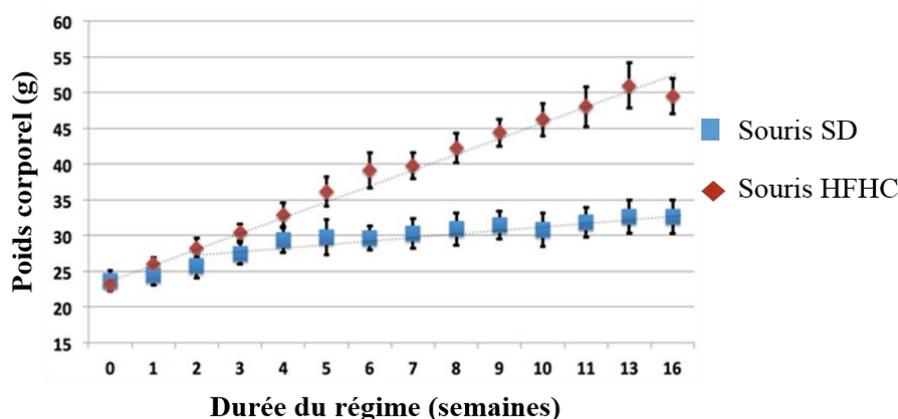


Figure 88 : Suivi du poids corporel moyen de souris SD et HFHC en fonction du temps.
Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

L'analyse histologique des coupes H&E de foie de souris HFHC, à la 16^{ème} semaine de régime, montre la présence d'une stéatose au stade 3 chez la moitié des souris (3/6), tandis que l'autre moitié présente un stade de 2 (Figure 89.A, C). Aucune ballonnisation hépatocytaire n'est détectée, tandis que quelques rares foyers inflammatoires sont observés, à la 16^{ème} semaine de régime HFHC. En effet, la plupart des souris (4/6) présentent un stade d'inflammation de 1 (Figure 89.C). La majorité des souris (5/6) n'a pas développé de fibrose hépatique, comme on peut le voir sur la coupe de foie de souris HFHC colorée au Sirius Red. Une seule souris (1/6) présente une fibrose péri-sinusoïdale légère (stade 1a) à la 16^{ème} semaine de régime (Figure

89.C). Contrairement aux modèles MCD et CDAHFD, aucune hypertrophie de HSCs n'est observée sur les coupes de foie de souris après 16 semaines de régime HFHC (Figure 89.C).

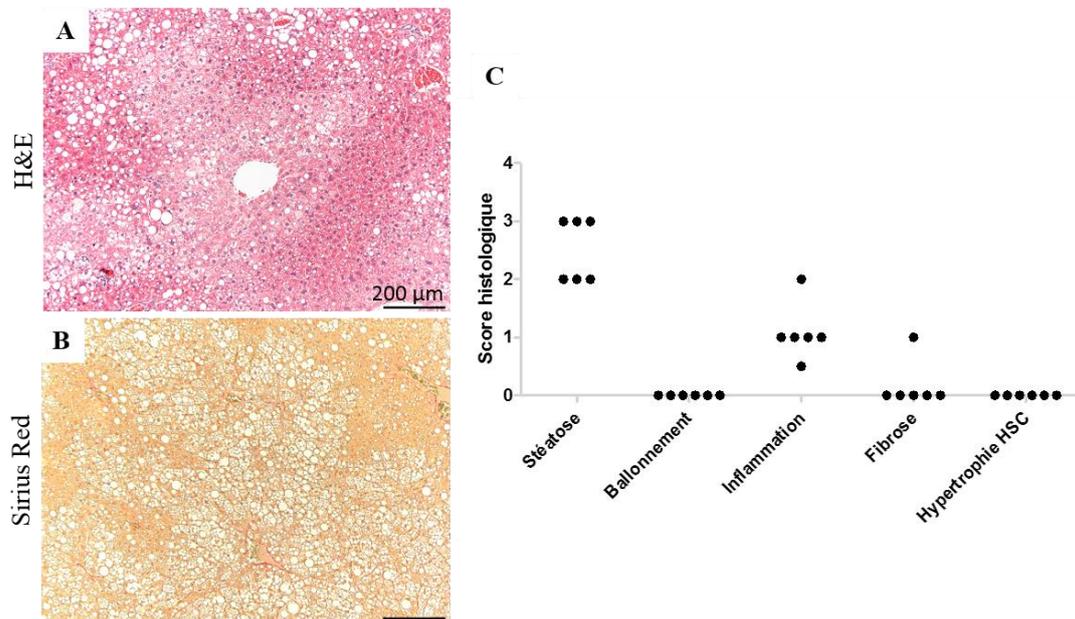


Figure 89 : Analyse histologique du modèle HFHC.

A et B) Coupes de foie de souris, après 16 semaines de régime HFHC, colorées à l'Hématoxyline et l'Eosine (A) et au Sirius Red (B). Barre d'échelle : 200 µm. C) Scores histologiques de stéatose, de ballonnisation, d'inflammation, de fibrose et d'hypertrophie de HSCs après 16 semaines de régime HFHC.

Cette absence d'hypertrophie sur les coupes de foie de souris HFHC peut être expliquée par l'absence de fibrose hépatique dans ce modèle. En effet, comme nous l'avons vu précédemment sur les coupes de foie des souris CDAHFD, l'accumulation des gouttelettes de rétinol est toujours associée aux fibres de collagène, alors que la majorité des souris HFHC ne présente pas de fibrose. De plus, si on compare les scores cliniques relatifs d'hypertrophie et de fibrose sur les coupes de foie des trois modèles métaboliques (MCD, HFHC et CDAHFD), on remarque que l'hypertrophie des HSCs semble être liée à la fibrose (Figure 90).

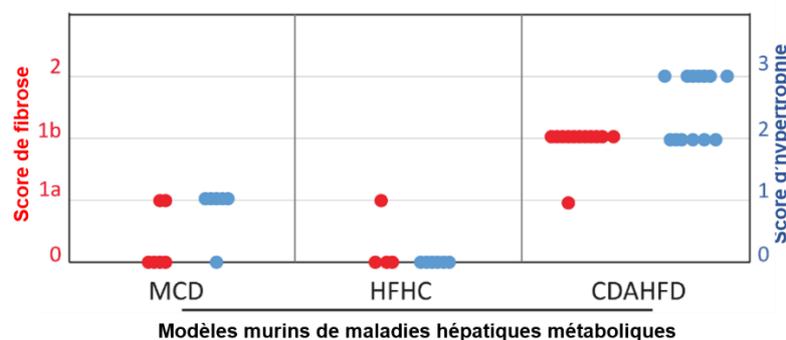


Figure 90 : Corrélation entre la fibrose et l'hypertrophie dans les modèles de maladies hépatiques métaboliques (MCD, HFHC et CDAHFD).

Score de fibrose hépatique (points rouges) et d'hypertrophie de HSCs (points bleus) chez des souris après 9 semaines de régime MCD, 16 semaines de régime HFHC et 22 semaines de régime CDAHFD.

6.2 Mise en évidence de l'hypertrophie des HSCs par microscopie multi-photonique

6.2.1 Modèles métaboliques

Les colorations conventionnelles étant moins sensibles que la fluorescence, une analyse par microscopie multi-photonique a été réalisée, pour les signaux RF et CF/SHG, sur les coupes hépatiques non colorées des souris MCD et HFHC.

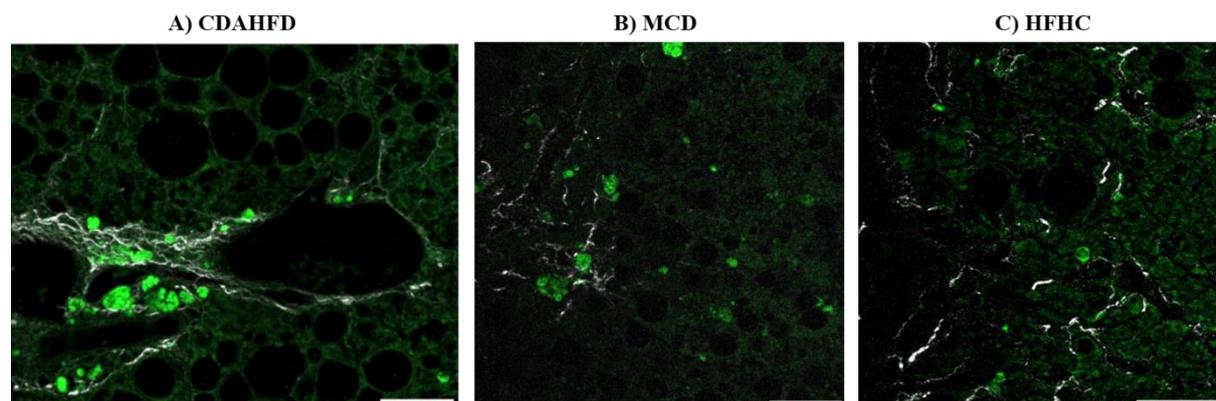


Figure 91 : Analyse par microscopie multi-photonique des coupes de foie de souris, CDAHFD, MCD et HFHC.

Coupes de foie imagées pour le signal de rétinoïdes (RF) par microscopie à fluorescence et les fibres de collagène (CF/SHG) par génération de seconde harmonique, après 9 semaines de régime CDAHFD (A) MCD (B), et 16 semaines de régime HFHC (C). Barre d'échelle : 50 μ m.

On peut observer la présence de zones d'accumulation de gouttelettes de rétinoïdes sur les coupes de foie de souris MCD, caractéristique de l'hypertrophie des HSCs (Figure 91.B), ce qui est similaire à ce qui a été observé dans le modèle CDAHFD (Figure 91.A). De plus, bien que les coupes de foie de souris HFHC, après colorations histologiques, ne présentent pas de cellules hypertrophiées, l'analyse par microscopie multi-photonique des coupes hépatiques non colorées de souris HFHC a permis de détecter la présence de rares zones d'accumulation de gouttelettes de rétinoïdes (Figure 91.C). Ces gouttelettes sont toujours associées à des dépôts de fibres de collagène, détectées par CF/SHG dans les trois modèles animaux (CDAHFD, MCD, HFHC) (Figure 91).

6.2.2 Autres modèles de fibrose hépatique

Nous avons ensuite voulu déterminer si l'hypertrophie des HSCs est également présente dans d'autres modèles de fibrose hépatique comme le modèle hépatotoxique CCl_4 et le modèle de cholestase hépatique par ligature de la voie biliaire (BDL), qui ne sont pas des modèles nutritionnels. Les coupes de foie des souris, après 8 semaines d'injection de CCl_4 ou 10 jours après la ligature de la voie biliaire, nous ont été fournies par le Dr. Fabienne Foufelle du Centre de Recherche des Cordeliers.

Comme nous avons démontré précédemment que la fluorescence est plus sensible que les colorations histologiques pour la détection des accumulations de gouttelettes de rétinoides, nous avons décidé de n'utiliser que la technique de microscopie multi-photonique pour observer une éventuelle présence de HSCs hypertrophiées dans ces deux modèles. Les coupes de foie non colorées des souris CCl₄ et BDL ont été analysées pour les signaux RF et CF/SHG.

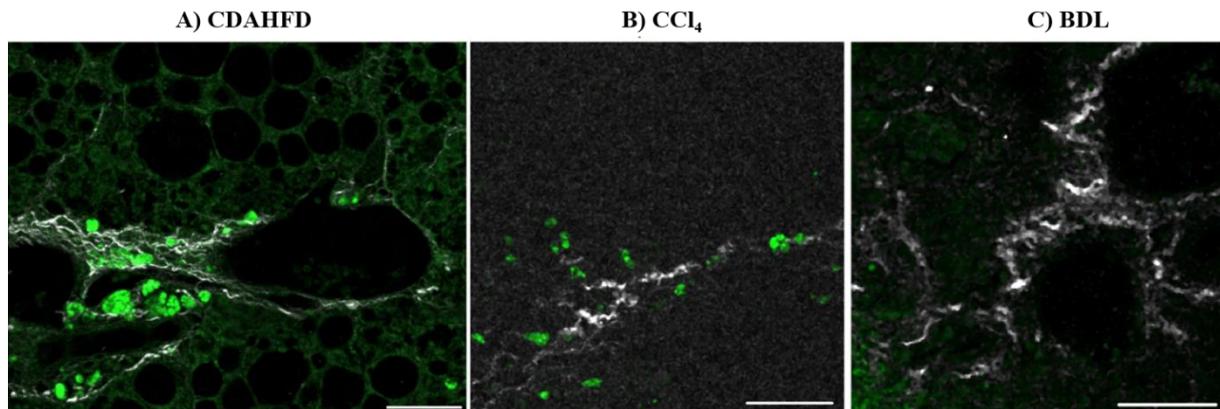


Figure 92 : Analyse par microscopie multi-photonique des coupes de foie de souris des modèles CDAHFD, CCl₄ et BDL.

Coupes de foie de souris imagées pour le signal de rétinoides (RF) par microscopie à fluorescence et les fibres de collagène (CF/SHG) par génération de seconde harmonique, après 9 semaines de régime CDAHFD (A), 8 semaines d'injection de CCl₄, et 10 jours après la ligature de la voie biliaire (BDL). Barre d'échelle : 50 µm.

Sur les coupes de foie des souris CCl₄, des accumulations fluorescentes de rétinoides sont bien visibles et sont également colocalisées avec les fibres de collagènes. En revanche, sur les coupes de foie des souris BDL, aucune accumulation de rétinoides n'est détectée ni dans les zones de dépôt de collagène, ni dans le parenchyme hépatique (Figure 92).

En résumé, ces résultats montrent que l'hypertrophie des HSCs n'est pas une caractéristique du modèle CDAHFD puisqu'elle est aussi observée dans d'autres modèles animaux comme MCD et HFHC. Ce phénomène semble être lié à la fibrose hépatique plutôt qu'à la NASH dès lors qu'il a été retrouvé dans le modèle hépatotoxique CCl₄, en plus des modèles nutritionnels de maladies hépatiques métaboliques. Cependant, aucune accumulation de gouttelettes de rétinoides n'a été observée dans le modèle BDL. Cela peut être expliqué par le fait que la fibrose hépatique dans le modèle cholestatique BDL est principalement induite par les myofibroblastes péri-portaux, contrairement aux modèles précédents dans lesquels les myofibroblastes responsables de la fibrose proviennent principalement de la différenciation des cellules stellaires hépatiques. Ainsi, les HSCs ne semblent pas être aussi impliquées dans le processus de fibrogénèse dans le modèle BDL que dans les autres modèles de fibrose (CDAHFD, MCD, HFHC, CCl₄).

7. Mise en évidence de l'hypertrophie des HSCs chez l'humain

7.1 L'hypertrophie des HSCs dans la fibrose hépatique métabolique humaine

Après avoir confirmé que l'hypertrophie des HSCs n'est pas une caractéristique du modèle CDAHFD et qu'elle semble être liée à la fibrose hépatique, nous avons voulu déterminer s'il s'agissait d'un phénomène dépendant de l'espèce. Nous avons donc recherché la présence potentielle de HSCs hypertrophiées dans le foie de patients atteints de fibrose hépatique.

Pour cela, nous avons sollicité le Dr. Frédéric Charlotte, pour sélectionner une série de patients répondant à nos critères d'intérêt, c'est-à-dire, présentant différents stades de fibrose hépatique. Dans un premier temps, les biopsies hépatiques humaines que nous avons étudiées proviennent de patients à qui, parallèlement à une chirurgie bariatrique, un prélèvement hépatique a été réalisé. Ces échantillons ont été obtenus avec l'accord du Pr. Karine Clément, responsable du protocole de recherche clinique dont font partie ces patients (FIBROTA, numéro P100503-IDRCB 2011-A00759-32) enregistré dans l'essai clinique (NCT01655017). Ces échantillons ont été choisis puisque les coupes histologiques de foie présentent une taille plus importante (0,5 à 1 cm² environ) que celle d'une biopsie hépatique classique réalisée à l'aiguille. Il était donc plus probable de détecter une éventuelle hypertrophie des HSCs sur ces coupes que sur une biopsie classique. Une fois les patients choisis, le service d'anatomopathologie de l'hôpital la Pitié-Salpêtrière a réalisé de nouvelles coupes hépatiques non colorées ou « blanches » pour notre analyse par microscopie multi-photonique.

Pour notre étude, 27 patients ont été sélectionnés en fonction de leur niveau de fibrose hépatique, allant de F0 à F4, déterminée par les anatomopathologistes, (n ≥ 4 par stade). Les caractéristiques des 27 patients sont décrites dans le Tableau 12.

	MEDIANE
NOMBRE DE PATIENTS	27
AGE A LA CHIRURGIE (ANS)	47 (22-67)
FEMME	80 %
HOMME	20 %
IMC (INDICE DE MASSE CORPORELLE)	43 (35-52)
MARQUEURS	
ALAT (UI/L)	34 (14-298)
ASAT (UI/L)	36 (19-117)
SCORE FIBROTEST¹	0,20 (0,33-0,66)

1. (Imbert-Bismut et al., 2001)

Tableau 12 : Caractéristiques des patients inclus dans l'étude.

Tous les patients font partie du même protocole d'étude clinique (FIBROTA, numéro P100503-IDRCB 2011-A00759-32) enregistré dans l'essai clinique (NCT01655017), qui inclus des patients ayant subi une chirurgie bariatrique durant laquelle un échantillon de foie a été prélevé.

Les biopsies hépatiques humaines ont été analysées par microscopie multi-photonique à l'aveugle pour les signaux RF et CF/SHG. Un exemple d'une coupe de foie humain est illustré dans la Figure 93. Des gouttelettes présentant un signal de fluorescence élevé sont observées sur certaines coupes hépatiques humaines (Figure 93, à gauche). Sur cette même coupe, on peut voir le signal spécifique des fibres de collagène par SHG (Figure 93, milieu). En superposant les deux images, on observe une colocalisation des deux signaux (Figure 93, à droite).

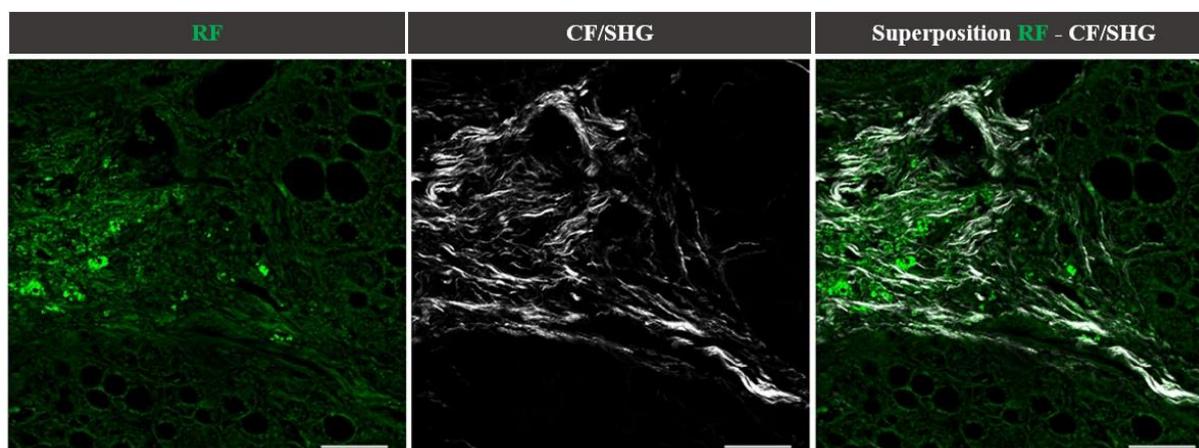


Figure 93 : Mise en évidence des accumulations de gouttelettes de rétinoïdes dans la fibrose hépatique humaine.

Images représentatives de la colocalisation des gouttelettes de rétinoïdes imagées par fluorescence (RF) et des fibres de collagène imagées par génération de seconde harmonique (CF / SHG) sur une biopsie hépatique humaine de la cohorte FIBROTA présentant une fibrose hépatique au stade F3. Barre d'échelle : 50 µm.

Une analyse spectrale des gouttelettes fluorescentes a été réalisée. Il est à noter que le tissu hépatique de ces patients présente une auto-fluorescence endogène importante, hétérogène et d'intensité variable d'un patient à un autre, contrairement aux coupes de foie de souris qui présentaient un spectre d'auto-fluorescence endogène du tissu homogène, quel que soit le

modèle étudié et identique d'une souris à une autre. Comme cela avait été fait pour les échantillons murins, une soustraction du spectre du bruit de fond du tissu a été réalisée, pour chaque coupe. L'analyse spectrale a montré que le signal de fluorescence des gouttelettes observé sur les coupes hépatiques humaines correspond effectivement au signal spécifique des rétinoïdes, confirmant ainsi la présence d'accumulation de gouttelettes de rétinoïdes associées aux fibres de collagène dans le foie humain.

L'association des deux signaux est observée sur la majorité des coupes hépatiques humaines présentant un score de fibrose \geq F1 (17/23). De plus, le signal des rétinoïdes est plus élevé sur les coupes présentant les scores F2 et F3 (Figure 94). Aucun signal de rétinoïdes n'est détecté sur les biopsies humaines ne présentant pas de fibrose (score F0) (Figure 94), ce qui est cohérent avec ce qui a été observé dans les modèles animaux.

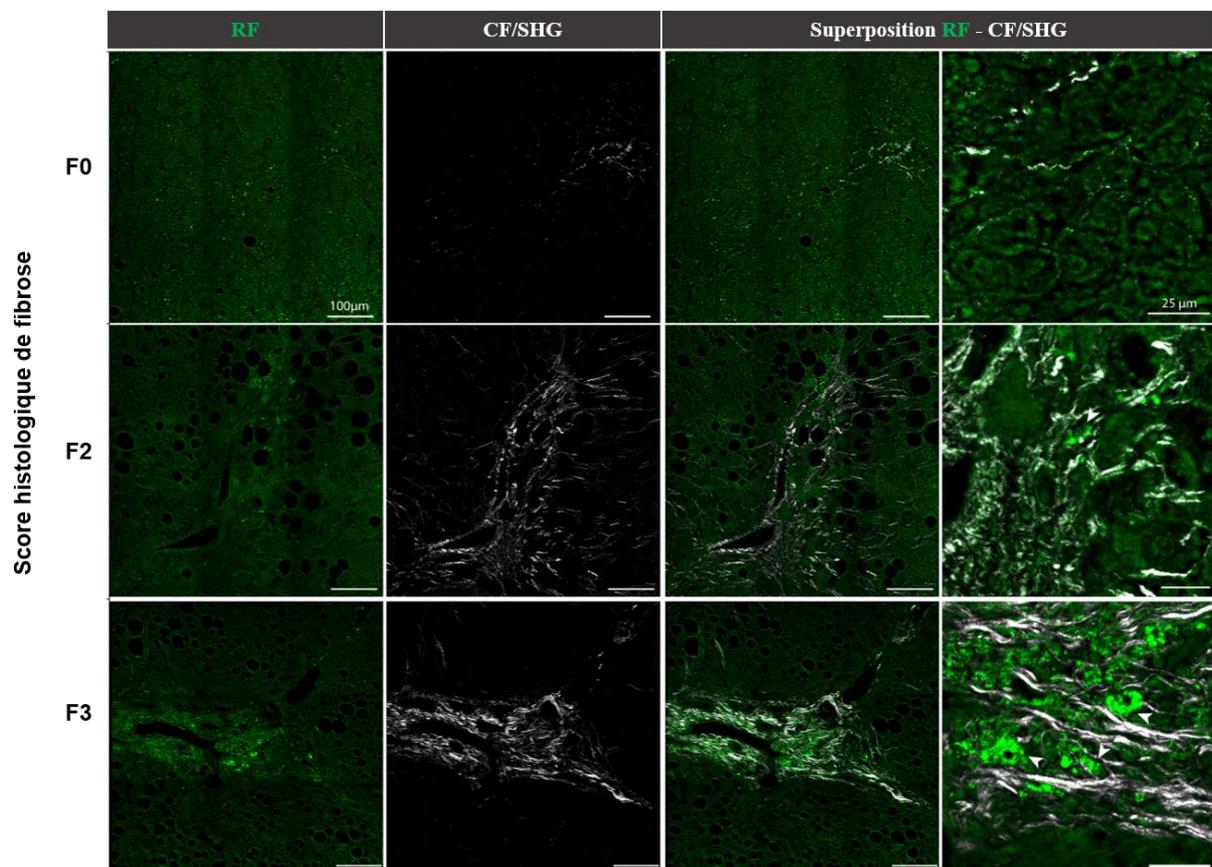


Figure 94 : Colocalisation des gouttelettes de rétinoïdes et des fibres de collagène sur les biopsies hépatiques humaines.

Images de microscopie multi-photonique de biopsies hépatiques humaines ne présentant aucune fibrose (F0), présentant une fibrose au stade 2 (F2) ou 3 (F3). Exemple de colocalisation de gouttelettes de rétinoïdes imagées par fluorescence (RF) et de collagène par génération de seconde harmonique (CF / SHG). Le panneau central droit est une superposition des deux signaux précédents. Barre d'échelle : 100 µm. Le panneau complètement à droite est un zoom sur une zone présentant les signaux RF et CF / SHG. Barre d'échelle : 25 µm.

Ces résultats confirment la présence de l'hypertrophie des HSCs, associée aux dépôts de fibres de collagène sur les coupes hépatiques humaines présentant une fibrose hépatique métabolique.

7.2 Corrélation entre l'hypertrophie des HSCs et la fibrose

Afin de quantifier le signal d'hypertrophie des HSCs, un score a été établi par le Dr. Céline Hoffmann et adapté pour les biopsies humaines, par analyse par microscopie confocale du signal de fluorescence des rétinoïdes sur les biopsies entières. Pour chaque coupe de patient, une analyse spectrale a été réalisée avant de scorer l'hypertrophie, afin de soustraire au signal des rétinoïdes le bruit de fond (l'auto-fluorescence) du tissu. Ce nouveau score est défini comme suit : 0 = pas d'hypertrophie visible, 1 = cellules hypertrophiées peu nombreuses, 2 = présence de 2 à 5 zones de cellules hypertrophiées, 3 = présence de plus de 5 zones de cellules hypertrophiées.

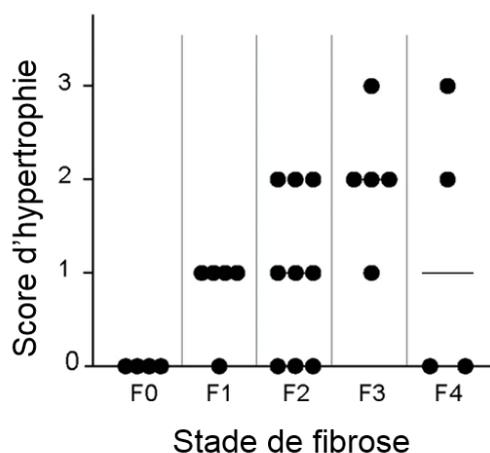


Figure 95 : Corrélation entre l'hypertrophie des HSCs et la fibrose hépatique humaine.

Score de fibrose hépatique et d'hypertrophie de HSCs sur 27 biopsies hépatiques humaines de la cohorte FIBROTA.

La Figure 95 représente l'évolution du score d'hypertrophie des HSCs en fonction des scores histologiques de fibrose, établis par les pathologistes sur les 27 échantillons. On remarque que le score d'hypertrophie est de 0 sur toutes les coupes de foie de patients ne présentant pas de fibrose (F0). Une hypertrophie des HSCs au stade 1 est détectée sur la majorité des coupes hépatiques humaines (4/5) présentant une fibrose au stade 1 (F1). Sur les coupes de foie de patients atteints de fibrose au stade F2, une variabilité du score d'hypertrophie a été observée allant de 0 à 2 avec 3/9 coupes par stade d'hypertrophie. Une hypertrophie allant de 1 à 3 et de 0 à 3 a été détectée sur les coupes de foie présentant une fibrose au stade F3 et F4 respectivement (Figure 95).

Afin de déterminer s'il existe une corrélation entre la fibrose et cette hypertrophie des HSCs, nous avons comparé les deux scores obtenus sur les 27 échantillons humains, en utilisant le coefficient de corrélation de Spearman (Figure 95). L'analyse statistique a montré que le score d'hypertrophie présente une relation positive significative avec le stade de fibrose avec $r = 0,48$ et $p = 0,01$, confirmant ainsi la corrélation entre l'hypertrophie et la fibrose.

7.3 Hypertrophie des HSCs dans la fibrose hépatique humaine induite par d'autres étiologies

Afin d'étendre notre étude à d'autres étiologies de fibrose hépatique, nous avons sollicité le Pr. Vlad Ratziu travaillant au service d'hépatogastro-entérologie de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Ainsi, 16 échantillons hépatiques humains supplémentaires ont été sélectionnés à partir de patients ayant subi une biopsie hépatique entre 2008 et 2019 pour suspicion de NASH (n = 4, avec fibrose F0, F2 ou F3), hépatite virale C (n = 7, avec fibrose F2 ou F3) ou fibrose induite par une consommation excessive d'alcool (n = 5, avec fibrose F4). De nouvelles coupes blanches de ces échantillons ont, comme précédemment, été réalisées par les techniciens du service d'anatomopathologie de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Ces échantillons humains présentent une taille plus petite que celles des patients obèses analysées précédemment puisque la biopsie a été réalisée, dans ce cas, à l'aide d'une aiguille.

Etiologies de fibrose hépatique

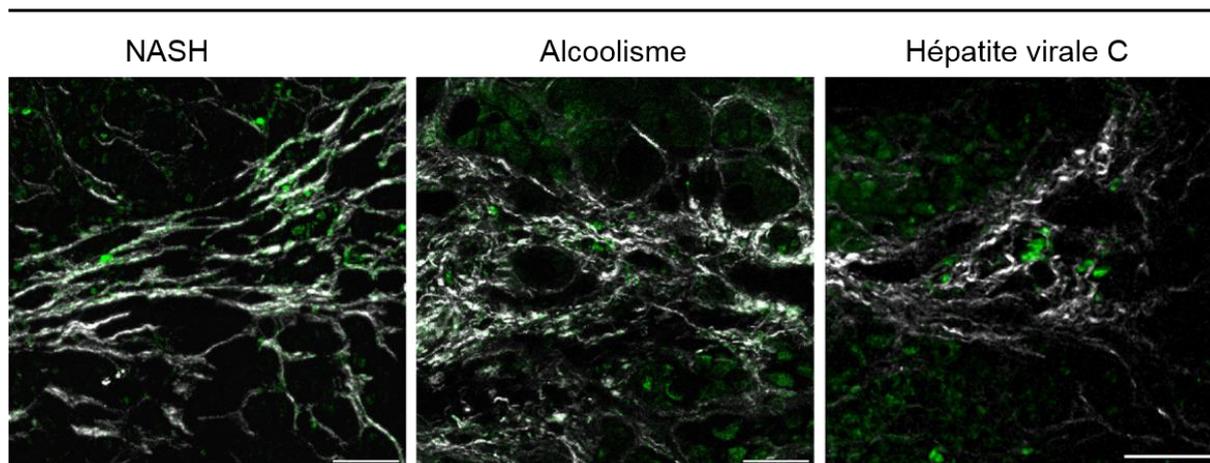


Figure 96 : Présence de HSCs hypertrophiées dans la fibrose hépatique humaine.

Superposition des signaux des rétinoïdes (RF) et des fibres de collagène (CF / SHG) imagées par fluorescence et génération de seconde harmonique sur des biopsies hépatiques humaines présentant une fibrose hépatique due à différentes étiologies : NASH (F2), alcoolisme (F4) et hépatite virale C (F2). Barre d'échelle : 50 μ m.

Comme pour les échantillons précédents, une analyse par microscopie multi-photonique a été réalisée. Un signal fluorescent d'accumulation de rétinoïdes est détecté sur toutes les coupes présentant un score de fibrose \geq F1. Ce signal est toujours à proximité des dépôts de fibres de collagène démontrant la présence de cellules hypertrophiées dans le foie des patients atteints de fibrose hépatique, quelle que soit l'étiologie (NASH, alcoolisme ou VHC) (Figure 96). Bien que la taille des biopsies hépatiques humaines analysées soit petite (environ 3 mm de largeur et < 2 cm de longueur), ce phénotype de HSCs hypertrophiées a tout de même pu être observé.

Ces résultats ont permis de mettre en évidence, pour la première fois chez l'humain, un phénomène d'hypertrophie des HSCs associé à la fibrose hépatique et dont la fréquence est corrélée au degré de fibrose. Ce phénotype particulier de HSCs, qui n'a jamais été décrit dans la littérature, a été retrouvé sur des biopsies hépatiques humaines de patients atteints d'une fibrose hépatique due à différentes étiologies (NASH, hépatite virale C ou alcoolisme). Il semble donc être associé à la fibrose hépatique plutôt qu'à la NASH.

8. Conclusion

Les travaux réalisés dans cette première partie de la thèse ont permis de caractériser un nouveau modèle de fibrose hépatique métabolique (CDAHFD) qui induit une fibrose marquée, progressive et très reproductible et qui semble présenter un profil histologique proche de celui observé chez des patients souffrant d'une NASH. Ce modèle est prêt à être utilisé pour le développement d'agents thérapeutiques pour la fibrose hépatique. Ce sera le sujet de la deuxième partie de ce travail dont l'objectif est de concevoir de nouveaux vecteurs à base d'ARN interférents, pour le traitement de la fibrose hépatique métabolique.

Lors de la caractérisation du modèle, nous avons mis en évidence une hypertrophie des cellules stellaires hépatiques, contenant une accumulation des gouttelettes de rétinoïdes dans leur cytoplasme. A notre connaissance, ce phénomène d'hypertrophie n'a jamais été décrit dans la littérature dans un contexte de fibrose hépatique. Après avoir dosé par HPLC la quantité globale des rétinoïdes dans le foie des souris CDAHFD, nous avons conclu que cette accumulation de rétinoïdes n'est pas induite par un sur-stockage des rétinoïdes dans le foie.

Les cellules stellaires, considérées comme la cible majeure pour le développement de thérapies anti-fibrotiques du foie ont été caractérisées, sur ce nouveau modèle de fibrose, *via* différents marqueurs. Les résultats obtenus ont permis la visualisation et l'identification d'un nouveau phénotype inattendu de HSCs, dans les zones d'hypertrophie, présentant à la fois les marqueurs de HSCs quiescentes et activées, notamment les rétinoïdes, le cRBP1, la desmine et le α -SMA. Les résultats obtenus suggèrent que plusieurs populations de HSCs coexistent dans ces zones d'hypertrophie.

La combinaison de la microscopie de fluorescence et de la génération de seconde harmonique, nous a permis de mettre en évidence, pour la première fois, la présence de HSCs hypertrophiées dans d'autres modèles nutritionnels de fibrose hépatique (MCD et HFHC) mais

également dans le modèle hépatotoxique CCl₄. Ces résultats confirment que l'hypertrophie de HSCs ne dépend pas du modèle et est étroitement liée à la fibrose hépatique.

Grâce à des collaborations avec des cliniciens de l'hôpital de la Pitié Salpêtrière, nous avons pu analyser, par les techniques de microscopie mises en place à l'institut Pasteur, des biopsies hépatiques humaines de patients présentant différents stades de fibrose due à différentes étiologies (NASH, alcoolisme, hépatite C). Une hypertrophie de HSCs a été détectée, pour la première fois, chez l'humain, en association avec la fibrose, confirmant que ce phénomène ne dépend pas de l'espèce et qu'il est lié à la fibrose hépatique plutôt qu'à la NASH. Une corrélation entre le stade de fibrose et d'hypertrophie a également été mise en évidence chez des patients obèses présentant différents niveaux de fibrose. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal Scientific Reports¹. Le texte intégral est en Annexe.

¹ Céline Hoffmann, Nour El Houda Djerir, Anne Danckaert, Julien Fernandes, Pascal Roux, Christine Charrueau, Anne-Marie Lachagès, Frédéric Charlotte, Isabelle Brocheriou, Karine Clément, Judith Aron-Wisnewsky, Fabienne Foufelle, Vlad Ratziu, Bernard Hainque, Dominique Bonnefont-Rousselot, Pascal Bigey & Virginie Escriou. Hepatic stellate cell hypertrophy is associated with metabolic liver fibrosis. *Sci Rep* **10**, 3850 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60615-0>

Chapitre II : Stratégie de vectorisation de siRNA pour l'inhibition de l'expression du collagène dans le modèle CDAHFD

L'objectif de cette deuxième partie de l'étude est de développer une stratégie d'extinction de l'expression du collagène de type 1 par administration de siRNA spécifiques dans les HSCs, dans le modèle murin de fibrose CDAHFD. Ce travail est divisé en trois parties : la première a pour but de comparer plusieurs formulations de siRNA et de déterminer, grâce à une étude de biodistribution, la formulation la plus efficace pour l'administration des siRNA aux cellules stellaires, la deuxième a pour objectif d'identifier une ou plusieurs séquences dirigées contre l'ARNm de Col1a1 capable(s) d'inhiber l'expression du collagène *in vitro*, la dernière étape vise à évaluer le potentiel thérapeutique des vecteurs de siRNA anti-Col1a1 dans le modèle de fibrose CDAHFD.

1. Formulation des siRNA

1.1 Stratégie de vectorisation des siRNA

Afin d'administrer des siRNA à des souris CDAHFD, nous avons choisi d'utiliser des vecteurs lipidiques, les lipoplexes, composés de lipide cationique et d'acide nucléique. Les lipoplexes présentent une facilité de préparation, une forte efficacité de transfert de siRNA *in vitro* et *in vivo* et sont classiquement utilisés dans notre laboratoire. Le lipide cationique choisi pour la formation des lipoplexes dans notre stratégie est le DMAPAP présentant une double chaîne en C14 (Figure 97). Il a été choisi au sein d'une banque de lipides cationiques synthétisés au laboratoire car sa préparation en liposome est aisée et reproductible. Il s'agit d'une lipopolyspermine à tête polaire globulaire, comprenant trois charges positives, qui lui permettent d'établir des interactions électrostatiques avec les acides nucléiques. Pour faciliter sa formulation en liposome et augmenter l'efficacité de transfection, on ajoute la DOPE, un lipide zwitterionique présentant une double chaîne en C18 (Figure 97). En effet, grâce à ses propriétés fusogéniques, notamment avec la membrane endosomale, la DOPE contribue à la libération des siRNA dans le cytosol. Le liposome DMAPAP/DOPE est couramment utilisé dans notre laboratoire en raison de sa faible toxicité et de son efficacité pour le transfert d'acide nucléique (Khoury et al., 2008; Rousseau et al., 2011). Pour former les liposomes, d'autres lipides neutres peuvent également être ajouté au DMAPAP, tels que le cholestérol, seul ou en combinaison avec la DOPE. Parce qu'il apporte plus de rigidité que la DOPE, le cholestérol permet d'augmenter la stabilité des lipoplexes lorsqu'ils sont utilisés *in vivo*.

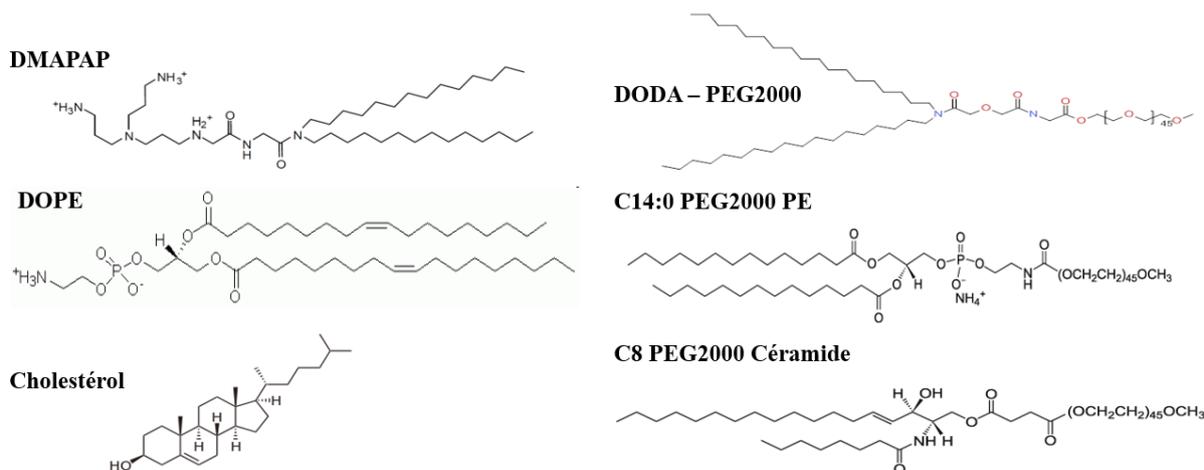
Des lipoplexes préparés à partir du liposome DMAPAP/DOPE et injectés par voie intraveineuse à une souris sont rapidement éliminés de la circulation par le système réticulo-endothélial (foie et rate), et présentent une rétention importante dans les poumons, entraînant ainsi une réduction de leur temps de circulation et une faible accessibilité aux organes cibles (Schlegel et al., 2013a). De plus, ces lipoplexes peuvent présenter une taille importante qui pourrait entraîner des complications lors de leur injection en IV. Enfin, les propriétés de surface de ces lipoplexes peuvent induire la formation d'agrégats.

Une des stratégies pour surmonter les limitations associées à l'administration systémique de ces lipoplexes est leur PEGylation. En effet, insérer un lipide PEGylé dans la formulation du liposome permet de conférer aux lipoplexes, préparés avec ce liposome dit « furtif », une charge de surface neutre et de minimiser ainsi leur absorption par les macrophages et leur élimination par le système réticulo-endothélial. La PEGylation améliore donc la stabilité des lipoplexes *in vivo* en augmentant le temps de circulation et la biodisponibilité des siRNA pour les organes cibles. De plus, elle permet de réduire la formation des agrégats en raison de la répulsion stérique liée aux molécules de PEG. Cependant, l'ajout d'un revêtement PEG, *via* l'insertion de lipide PEGylé, stabilise les lipoplexes en phase lamellaire, réduisant ainsi leur dissociation. Il peut également réduire l'interaction des lipoplexes avec la membrane endosomale et la libération des siRNA dans le cytosol, diminuant ainsi leur efficacité de transfection (Holland et al., 1996; Remaut et al., 2007; Shi et al., 2002; Song et al., 2002).

Il a été démontré que la longueur des molécules PEG influence l'efficacité des lipoplexes PEGylés. Les molécules PEG très courtes ne peuvent pas empêcher l'absorption par le système réticulo-endothélial et augmenter le temps de circulation sanguine, tandis que les molécules PEG de très longues chaînes conduisent à une baisse significative de l'activité de transfection. Il a été démontré que les dérivés de PEG d'une masse moléculaire de 2000 Da sont les plus appropriés pour la stabilisation des lipoplexes dans le sang (Nosova et al., 2019).

Dans sa thèse, Anne Schlegel a montré que la densité du revêtement PEG a également un effet sur l'efficacité des lipoplexes. En effet, plus le pourcentage du lipide-PEG ajouté est élevé, plus la densité de couverture est importante. L'ajout de moins de 3% de lipide PEG induit un encombrement stérique qui favorise la stabilité colloïdale du complexe et empêche la formation d'agrégats. Cependant, ce pourcentage n'est pas suffisant pour masquer la charge de surface des lipoplexes. Ainsi, l'internalisation cellulaire des lipoplexes n'est pas inhibée. En revanche, une diminution de l'efficacité de transfection est observée, probablement en raison de la réduction du relargage endosomal des siRNA. Au contraire, un effet sur la charge de surface est observé à partir de 5% de lipide-PEG ajouté, entraînant une diminution de l'internalisation cellulaire des lipoplexes et une réduction de l'efficacité de transfection (Thèse

de Anne Schlegel, 2012). Nous avons donc choisi d'utiliser des lipides PEGylés avec un pourcentage molaire de 3% et une taille de 2000 Da.



DMAPAP	2-{3-[Bis-(3-amino-propyl)-amino]-propylamino}-N-ditetradecyl carbamoyl methyl-acetamide
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
C14:0 PEG2000 PE	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]
C8 PEG2000 céramide	N-octanoyl-sphingosine-1-{succinyl[methoxy(polyethylene glycol)2000]}
DODA – PEG2000	dioctadecylcarbamoylmethoxyacetylamino)acetic acid(methoxy)-polyethylene glycol 2000

Figure 97 : Structure des différents lipides utilisés pour la préparation des liposomes.

Une des solutions proposées afin d'améliorer l'efficacité des lipoplexes PEGylés est d'utiliser des lipides-PEG possédant des chaînes carbonées de petite taille, tels que le lipide-PEG-céramide (Figure 97), leur permettant de s'extraire facilement du lipoplexe, facilitant ainsi l'interaction avec la membrane endosomale et la libération du siRNA dans le cytosol (Shi et al., 2002; Simoes et al., 2004). De plus, si l'extraction du lipide PEGylé a lieu avant l'internalisation cellulaire, les lipoplexes peuvent se transformer en complexes non furtifs interagissant ainsi avec la membrane cellulaire et favorisant la libération des siRNA dans le cytosol.

1.2 Caractérisation des différentes formulations de liposome cationique

1.2.1 Détermination de la taille des liposomes et des lipoplexes par DLS

Plusieurs formulations de liposomes ont été préparées avec la méthode d'hydratation du film lipidique, décrite par Bangham en 1965, qui consiste à dissoudre les lipides dans un solvant organique : le chloroforme, puis à évaporer le solvant pour obtenir un film lipidique. Ce film est ensuite hydraté et extrudé permettant la formation de vésicules unilamellaires (voir Matériels

et méthodes). Les liposomes utilisés ainsi que le rapport molaire entre les différents composants lipidiques sont représentés dans le Tableau 13.

Liposomes	Rapport molaire
DMAPAP / DOPE	(1 : 1)
DMAPAP / Chol	(1 : 1)
DMAPAP / DOPE / Chol	(1 : 0,5 : 0,5)
DMAPAP / DOPE / DODAPEG	(1 : 1 : 0,06)
DMAPAP / DOPE / C14 PEG	(1 : 1 : 0,06)
DMAPAP / DOPE / cer PEG	(1 : 1 : 0,06)
DMAPAP / DOPE / Chol / cer PEG	(1 : 0,5 : 0,5 : 0,06)

Tableau 13 : Différentes formulations de liposomes testés.

Liste des sept formulations de liposomes préparés et rapport molaire entre les lipides formant ces liposomes.

L'analyse par DLS (diffusion dynamique de la lumière) a permis de déterminer la taille des différentes formulations liposomales. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 14. Tous les liposomes présentent des diamètres hydrodynamiques relativement proches, les valeurs sont comprises entre 87 et 146 nm. Excepté le DMAPAP/DOPE/C14 PEG qui présente un indice de polydispersité de 0,41, les valeurs de Pdl sont inférieures à 0,26 pour tous les autres liposomes indiquant ainsi une distribution de taille assez étroite. Le DMAPAP/DOPE/Chol présente la plus petite taille (diamètre = 87 nm) et le plus faible indice de polydispersité (Pdl = 0,1). Enfin, parmi les liposomes PEGylés, le DMAPAP/DOPE/Chol/CerPEG présente le plus petit diamètre hydrodynamique (90 nm).

	LIPOSOME		LIPOPLEXES DE siRNA			
		R4	R6	R8	R10	
DMAPAP/DOPE	139 ± 0,4 (0,18)	p	235,5 ± 0,2 (0,15)	196,7 ± 1,6 (0,14)	182,0 ± 0,9 (0,10)	
DMAPAP/CHOL	137 ± 0,9 (0,25)	p	p	p	p	
DMAPAP/DOPE/CHOL	87 ± 0,4 (0,10)	253,9 ± 1,2 (0,29)	121,9 ± 1,0 (0,18)	104,5 ± 0,4 (0,24)	105,6 ± 0,4 (0,26)	
DMAPAP/DOPE/DODAPEG	147,7 ± 0,5 (0,17)	206,2 ± 1,2 (0,27)	207,6 ± 2,6 (0,24)	197 ± 1,6 (0,45)	n.d	
DMAPAP/DOPE/C14 PEG	146 ± 0,7 (0,41)	274,0 ± 5,0 (0,43)	153,2 ± 0,6 (0,20)	130,5 ± 0,4 (0,21)	128,7 ± 1,1 (0,23)	
DMAPAP/DOPE/CER PEG	113 ± 0,7 (0,26)	163,0 ± 0,6 (0,16)	112,5 ± 0,7 (0,19)	114,3 ± 0,5 (0,18)	114,6 ± 0,9 (0,22)	
DMAPAP/DOPE/CHOL/CER PEG	90 ± 0,9 (0,20)	p	226,9 ± 1,9 (0,22)	140,0 ± 1,6 (0,18)	122,4 ± 1,5 (0,20)	

Tableau 14 : Détermination de la taille des liposomes et des lipoplexes de siRNA.

Mesure par DLS de la taille (en nm) des différentes formulations de liposomes et de lipoplexes de siRNA en fonction du rapport de charges utilisé, R : rapport entre les charges positives du liposome et les charges négatives apportées par le siRNA et l'adjuvant anionique (plasmide). p : précipité, n.d : non déterminé. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux Pdl. (n=3 pour chaque condition).

Des lipoplexes sont ensuite formés par interactions électrostatiques entre le liposome et un mélange de siRNA et d'un adjuvant anionique. Cet adjuvant, dans ce cas un plasmide ne comportant pas de cassette d'expression, est ajouté afin d'améliorer l'efficacité de condensation des siRNA (Rhinn et al., 2009). Ces complexes sont préparés à différents rapports de charges, qui correspondent au ratio entre les charges positives du liposome cationique et les charges négatives apportées par le siRNA et le plasmide (R+/-) (R+/- = nmol

de charges (+) / nmol de charges (-)). Ce rapport de charges influence les propriétés physico-chimiques des lipoplexes. Le diamètre hydrodynamique des lipoplexes ainsi formés est mesuré par DLS selon le rapport de charges testé ($R_{+/-} = 2 ; 4 ; 6 ; 8$ et 10) (Tableau 14).

Tous les lipoplexes forment des précipités à $R = 2$, les résultats ne sont pas présentés dans le tableau. Les lipoplexes préparés avec le liposome DMAPAP/Chol forme des agrégats quel que soit le rapport de charge testé. De plus, lors de sa préparation, ce liposome était très difficile à extruder. Cette formulation a donc été éliminée pour la suite des expériences. Le diamètre hydrodynamique des différentes formulations, ainsi que l'indice de polydispersité, diminuent lorsque le rapport de charges augmente, ce qui confirme un effet du rapport de charge sur la taille des lipoplexes. A R_4 , les lipoplexes formés avec le DMAPAP/DOPE précipitent. L'ajout du cholestérol ou d'un lipide PEGylé (DODA, céramide ou C14) au DMAPAP/DOPE empêche l'agrégation des lipoplexes dès R_4 tandis que l'ajout des deux simultanément (cholestérol et céramide-PEG) entraîne la formation d'agrégats. A partir de R_6 , la taille des lipoplexes contenant un lipide PEGylé échangeable ou le cholestérol est d'environ 100 nm alors que la taille des lipoplexes préparés avec le DMAPAP/DOPE seul ou en combinaison avec un lipide PEGylé non échangeable (DODAPEG) est d'environ 200 nm.

Ces résultats confirment que l'ajout du cholestérol ou d'un lipide PEGylé échangeable au liposome DMAPAP/DOPE permet d'obtenir une taille de lipoplexe compatible avec une injection IV.

1.2.2 Evaluation de l'efficacité des différentes formulations de lipoplexes *in vitro*

Afin d'étudier l'efficacité d'inhibition des différentes formulations de lipoplexes, des cellules B16 exprimant le gène de la luciférase (B16Luc) sont transfectées par des lipoplexes contenant un siRNA dirigé contre la luciférase (siLuc). Ces lipoplexes sont préparés avec les six formulations liposomales décrites précédemment en faisant varier le rapport de charges ($R = 4 ; 6 ; 8$ et 10). Le même plasmide a été utilisé en tant qu'adjuvant anionique. Le pourcentage d'inhibition de la luciférase est calculé par rapport aux cellules non transfectées (Figure 98). Un contrôle négatif a été réalisé en remplaçant le siLuc par un siRNA contrôle et n'a pas montré d'inhibition de l'activité de la luciférase, confirmant ainsi la spécificité de l'activité d'inhibition observée.

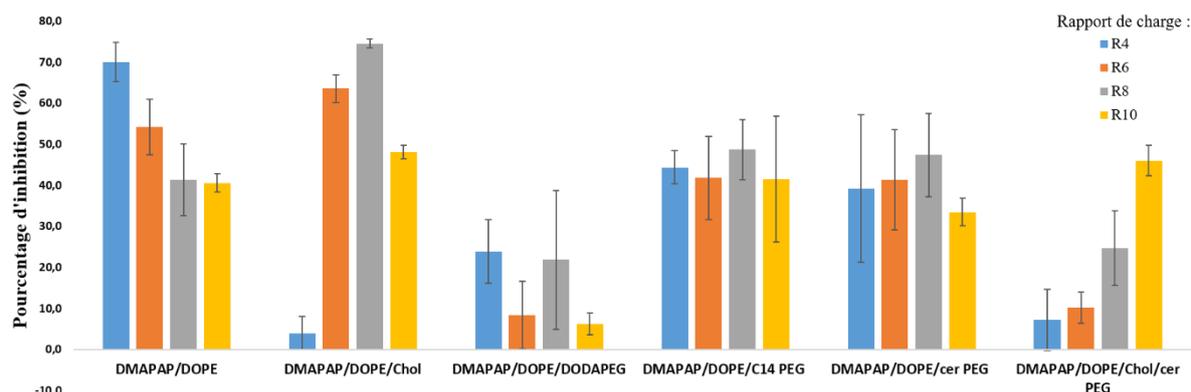


Figure 98 : Activité d'extinction de la luciférase des différentes formulations sur les cellules B16Luc.

Pourcentages d'inhibition de l'expression de la luciférase après transfection des cellules B16Luc avec différentes formulations de lipoplexes contenant un siRNA ciblant la Luciférase en fonction du rapport de charges utilisé. L'efficacité d'extinction est exprimée en % d'inhibition de l'activité luciférase par rapport aux cellules non transfectées. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. (n = 3 pour chaque condition). R : Rapport entre les charges positives du liposome et les charges négatives apportées par le siRNA et l'adjuvant anionique (plasmide).

Un effet du rapport de charges sur l'efficacité d'inhibition de la luciférase est observé pour les lipoplexes préparés avec les liposomes DMAPAP/DOPE, DMAPAP/DOPE/Chol et DMAPAP/DOPE/Chol/Cer PEG (Figure 98). Cet effet du rapport de charges n'est pas retrouvé avec les liposomes PEGylés : DMAPAP/DOPE/C14 PEG ou DMAPAP/DOPE/CerPEG. Cela peut être expliqué par la diminution de la charge de surface de ces lipoplexes par la PEGylation. Cette observation n'est pas retrouvée avec le DMAPAP/DOPE/Chol/Cer PEG. Cela peut être dû à la rigidité apportée par le cholestérol qui peut perturber l'extraction du lipide PEGylé du lipoplexe.

Les lipoplexes préparés avec les liposomes DMAPAP/DOPE et le DMAPAP/DOPE/Chol présentent une efficacité d'inhibition maximale de la luciférase de 70% à R4 et 75% à R8, respectivement, avec une faible variabilité observée. L'ajout de lipides PEGylés aux deux formulations précédentes entraîne une diminution de l'efficacité d'inhibition de ces formulations, avec une augmentation de la variabilité. Cette diminution est très importante avec le liposome contenant le lipide DODAPEG, qui présente une efficacité d'inhibition qui ne dépasse pas 25%, quel que soit le rapport de charges testé. Cependant, une efficacité d'inhibition *in vitro* d'environ 40% est conservée avec un lipide PEGylé échangeable comme le C14 PEG ou le céramide PEG, qui présentent de courtes chaînes aliphatiques.

Ces résultats montrent que la PEGylation modifie les caractéristiques des lipoplexes les rendant indépendants du rapport de charges. La taille du lipide PEGylé ajouté dans ces lipoplexes semble influencer sur leur efficacité de transfection. En effet, l'ajout d'un petit lipide PEGylé échangeable permet de conserver une efficacité d'inhibition notable indépendamment du rapport de charge, tandis qu'une diminution importante de

l'efficacité est constatée en utilisant un lipoplexe contenant un lipide PEGylé non échangeable présentant de longues chaînes aliphatiques comme le DODAPEG.

1.3 Etude de la distribution des différentes formulations de lipoplexes dans les cellules hépatiques

Afin de déterminer parmi les six formulations préparées, celle qui permet une internalisation préférentielle par les cellules stellaires hépatiques, une étude de la distribution des différentes formulations dans le foie des souris a été réalisée.

1.3.1 Analyse de la distribution par cytométrie

Les six formulations, caractérisées précédemment, contenant un siRNA fluorescent couplé à un fluorophore AlexaFluor-488, ont été administrées en IV à des souris SD. Afin de récupérer les cellules hépatiques, une dissociation enzymatique *in situ* du foie de ces souris est réalisée deux heures après l'injection. Ces cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux, afin de quantifier le nombre de cellules présentant un signal fluorescent lié au siRNA-Alexa488. Les résultats obtenus ainsi que le nombre de souris injectées avec la même formulation sont indiqués dans la Figure 99.

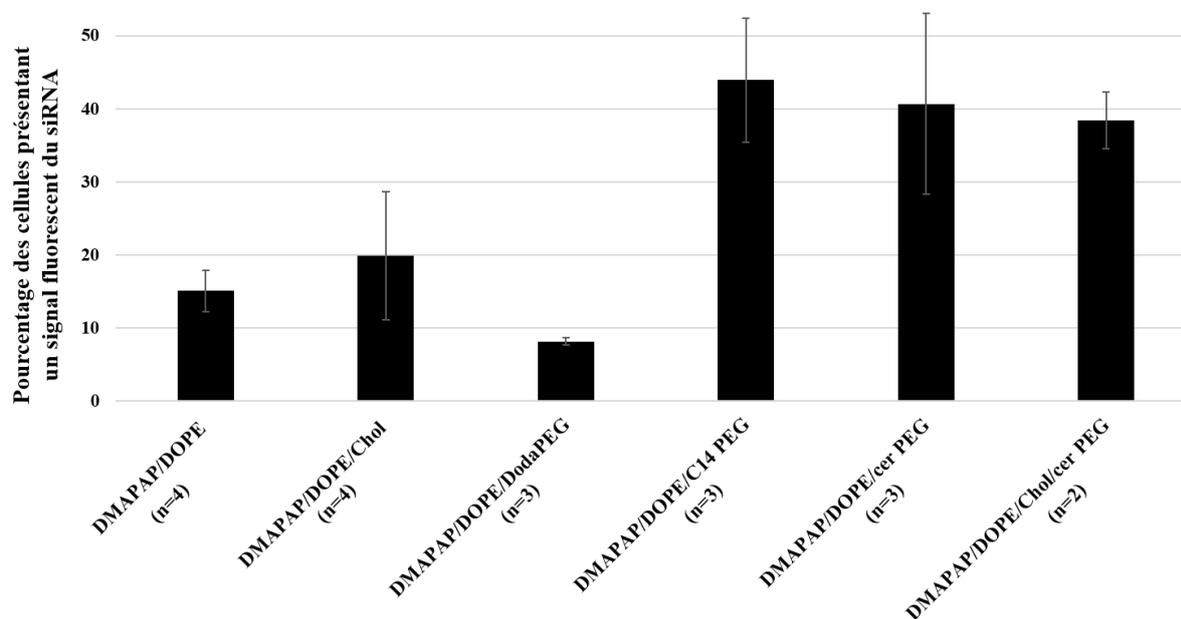


Figure 99 : Quantification des cellules hépatiques présentant un signal fluorescent du siRNA après injection IV des différentes formulations de lipoplexes.

Les cellules hépatiques ont été récupérées après dissociation enzymatique *in situ* du foie des souris SD 2h après l'injection d'une des 6 formulations de lipoplexes contenant un siRNA-Alexa488 (1mg/kg, R8). Le graphe présente la quantification par cytométrie en flux du pourcentage de cellules hépatiques présentant un signal de fluorescence lié au siRNA, par rapport aux cellules hépatiques totales. n : correspond au nombre de souris injectées avec la même formulation. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

On remarque que 15 et 20% des cellules hépatiques récupérées présentent un signal fluorescent du siRNA-Alexa488 avec les formulations DMAPAP/DOPE et DMAPAP/DOPE/Chol, respectivement. En utilisant le liposome DMAPAP/DOPE/DODAPEG, un signal du siRNA est retrouvé dans moins de 10% des cellules hépatiques, démontrant la faible efficacité de ce liposome pour l'administration des siRNA aux cellules, comme cela a déjà été observé *in vitro*. En revanche, le pourcentage des cellules hépatiques présentant un signal de fluorescence associé au siRNA est multiplié par 2, en utilisant les trois autres lipoplexes contenant des lipides PEGylés échangeables (DMAPAP/DOPE/C14PEG, DMAPAP/DOPE/CerPEG et DMAPAP/DOPE/Chol/CerPEG). Cela confirme l'intérêt de l'utilisation de ces lipides PEGylés échangeables pour l'administration des siRNA *in vivo*.

Afin d'étudier la répartition des siRNA-Alexa488 dans les différents types de cellules hépatiques, un immuno-marquage est réalisé pour chaque type cellulaire (CD31 : cellules endothéliales, F4/80 : cellules de Kupffer, ASGPR : hépatocytes et desmine : cellules stellaires hépatiques). Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux, afin de quantifier, pour chaque formulation, les cellules présentant à la fois le signal de fluorescence lié au marquage (anticorps secondaire couplé à un fluorophore Alexa647) et celui associé au siRNA-Alexa488. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 100.

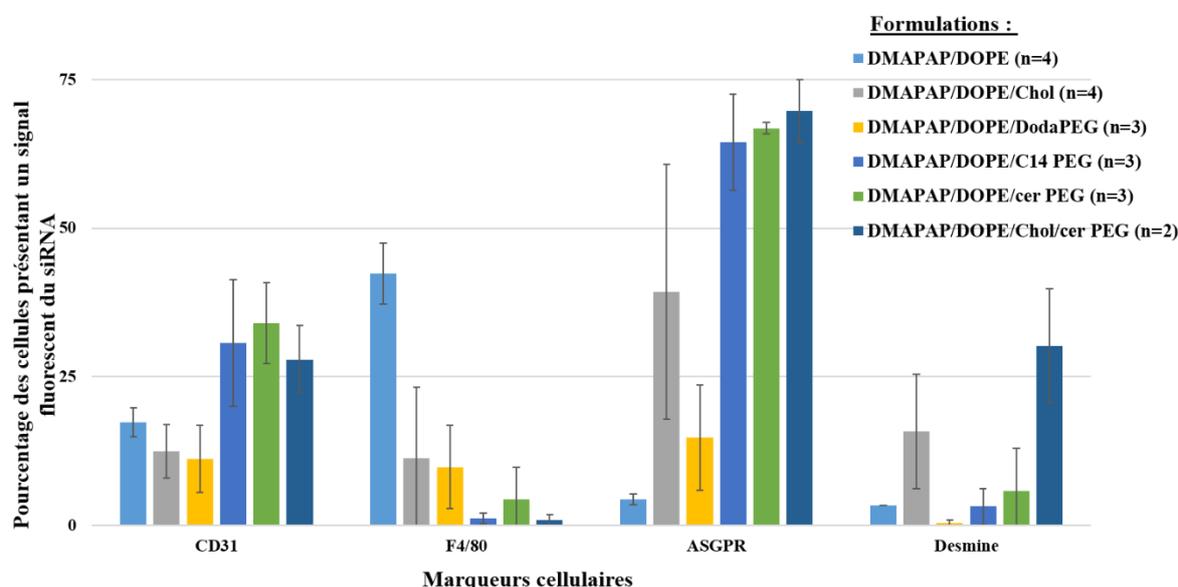


Figure 100 : Détermination des types cellulaires ayant internalisé les siRNA fluorescents après injection IV des lipoplexes.

Quantification par cytométrie en flux du pourcentage de chaque type cellulaire parmi les cellules présentant le signal fluorescent du siRNA, 2h après injection IV des souris SD avec les différentes formulations de lipoplexes contenant un siRNA-Alexa488. Après dissociation enzymatique *in situ* du foie, un immuno-marquage a été réalisé pour différencier les différents types cellulaires : CD31 : cellules endothéliales, F4/80 : cellules de Kupffer, ASGPR : hépatocytes, desmine : cellules stellaires. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart-type. Le nombre de souris injectées (n) est donné pour chaque formulation.

On remarque que 42% des cellules ayant internalisé les siRNA-Alexa488 administrés avec les lipoplexes à base de DMAPAP/DOPE sont des cellules de Kupffer et 17% correspondent à des cellules endothéliales. Les hépatocytes et les cellules stellaires représentent une très faible proportion (<5%) de la population cellulaire ayant internalisé les siRNA, en utilisant cette formulation. L'ajout du cholestérol au DMAPAP/DOPE diminue l'internalisation des siRNA par les cellules de Kupffer (11% au lieu de 42%) et augmente l'internalisation par les hépatocytes (39% au lieu de 4%) et les HSCs (16% au lieu de 3%). De même, l'ajout d'un lipide PEGylé échangeable (comme C14PEG ou CerPEG) semble diminuer de manière importante l'internalisation des siRNA par les cellules de Kupffer et augmenter la localisation des siRNA dans les autres types cellulaires, en particulier les hépatocytes qui représentent 70 % des cellules ayant internalisé les siRNA en utilisant les lipides PEGylés. L'utilisation de la formulation DMAPAP/DOPE/DODAPEG ne favorise pas l'administration des siRNA dans un type cellulaire particulier. De plus, elle ne permet pas une internalisation des siRNA par les HSCs, c'est pourquoi, cette formulation a été écartée pour la suite des expériences. Enfin, en utilisant la formulation DMAPAP/DOPE/Chol/CerPEG, 30% des cellules ayant internalisé les siRNA correspondent à des cellules stellaires hépatiques.

Ces résultats montrent que l'ajout du cholestérol ou d'un lipide PEGylé permet de diminuer l'internalisation des siRNA par les macrophages et d'augmenter leur accessibilité aux autres cellules hépatiques telles que les hépatocytes et les cellules stellaires. De plus, les deux formulations DMAPAP/DOPE/Chol et DMAPAP/DOPE/Chol/CerPEG présentent une internalisation importante dans les cellules stellaires. Cependant, ces résultats ont été obtenus sur des souris SD, c'est-à-dire sur un foie sain, sans fibrose. Or, l'architecture d'un foie fibrotique est très différente d'un foie sain, comme on a pu le voir dans le premier chapitre des résultats. Ce paramètre peut donc influencer l'accessibilité des siRNA aux différents types de cellules hépatiques. Par conséquent, la même étude doit être reproduite sur des souris CDAHFD atteintes de fibrose, afin de déterminer si la distribution des différentes formulations de siRNA est similaire à celle observée sur des souris SD. Pour cela, la technique de dissociation enzymatique *in situ* de foie et de récupération des cellules hépatiques doit être adaptée pour les souris CDAHFD. En effet, comme le foie fibrotique présente une accumulation des fibres de collagène, la concentration des enzymes utilisées pour la dissociation, en particulier la collagénase, ainsi que le temps de perfusion doivent être augmentés. Des mises au point sont actuellement en cours afin d'optimiser ce protocole.

1.3.2 Analyse de la distribution par microscopie

Afin de visualiser la localisation des siRNA dans le tissu hépatique, en fonction des différentes formulations utilisées, une étude de la distribution des siRNA a été réalisée par microscopie de fluorescence, sur des coupes de foie de souris injectées avec des lipoplexes contenant des siRNA fluorescents. Contrairement à la cytométrie, la technique de microscopie permet de déterminer si la distribution des siRNA est homogène dans tout le tissu hépatique ou si le signal du siRNA est concentré uniquement au niveau des zones péri-vasculaires. Pour cela, nous avons choisi de réaliser des coupes hépatiques au vibratome. Ces coupes sont plus épaisses (50 μm) que les coupes en paraffine (4 μm) réalisées à l'aide du microtome, et permettent de visualiser des cellules entières sur la coupe et ainsi de mieux évaluer l'internalisation des siRNA dans les différentes cellules hépatiques. De plus, cette technique est précédée par une étape de fixation par perfusion (*in situ*) qui permet une fixation homogène du foie, de manière à bien « figer » les structures, contrairement à la fixation par immersion, utilisée avant la réalisation des coupes en paraffine, qui est susceptible de moins fixer le centre du tissu que sa périphérie, entraînant parfois une fixation inhomogène du foie. Un autre avantage de cette technique est l'absence de l'étape de déshydratation par les solvants chimiques, nécessaire pour l'inclusion de l'organe en paraffine. Ces étapes sont susceptibles d'entraîner une perte du signal de fluorescence lié au siRNA par probable dissociation des lipoplexes par dissolution des lipides dans les solvants utilisés. La réalisation des coupes au vibratome est donc une méthode plus « douce » pour les tissus. Enfin, les coupes réalisées au vibratome sont conservées dans le saccharose qui permet d'éviter la formation de cristaux lors de la congélation et de bien préserver la morphologie cellulaire.

1.3.2.1 Caractérisation des cellules hépatiques

La première étape avant l'analyse des coupes de souris injectées avec les différentes formulations, est la validation des marqueurs de cellules hépatiques sur des coupes réalisées au vibratome. Pour cela, les coupes hépatiques de souris SD et CDAHFD ont été marquées par la phalloïdine fluorescente (phalloïdine-FITC) pour visualiser les filaments d'actine des cellules.

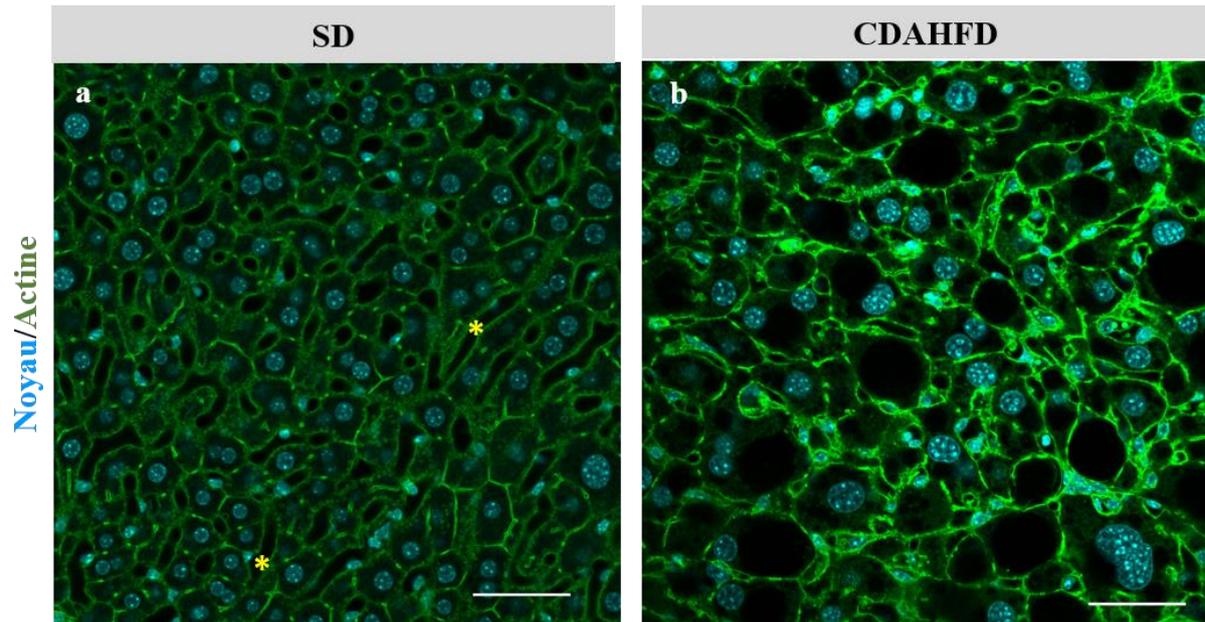


Figure 101 : Visualisation de la structure d'un foie sain de souris SD et d'un foie fibrotique de souris CDAHFD.

Coupes hépatiques de souris SD (a) ou CDAHFD (b) après marquage de l'actine par la phalloïdine-FITC (vert) et des noyaux par le DAPI (bleu), imagées par microscopie confocale. (Étoiles : sinusoides). Barre d'échelle : 50 μ m.

La Figure 101.a représente un exemple d'une coupe de foie d'une souris SD marquée par la phalloïdine-FITC. On peut observer, de manière très claire, l'architecture d'un foie sain, constitué de lames d'hépatocytes. Ces grandes cellules présentent une forme polyédrique et possèdent un gros noyau rond, en position centrale, avec l'hétérochromatine bien visible, caractéristique des noyaux cellulaires de souris. On peut également voir les sinusoides (étoiles, Figure 101.a) bordés par les cellules endothéliales sinusoidales, ayant une forme allongée et possédant un petit noyau aplati et condensé, ce qui permet de les distinguer facilement des hépatocytes. L'aspect des coupes de foie des souris CDAHFD est très différent de celui des coupes hépatiques de souris SD. Le tissu hépatique est destructuré, les hépatocytes présentent des gouttelettes lipidiques (en noir), caractéristiques de la stéatose hépatique. Il est plus difficile de distinguer les sinusoides sur les coupes de souris CDAHFD, en raison de l'abondance des vésicules lipidiques (Figure 101.b).

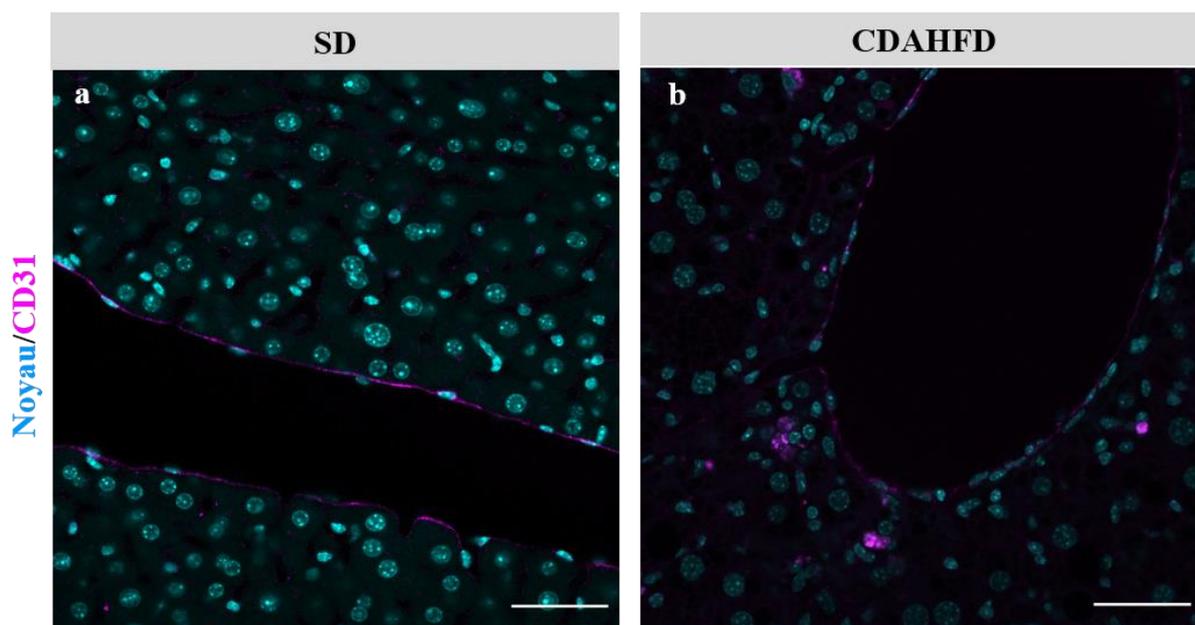


Figure 102: Visualisation des cellules endothéliales sur des coupes de foie de souris SD et CDAHFD.

Coupes hépatiques de souris SD (a) ou CDAHFD (b) après marquage du CD31 (anticorps secondaire couplé à un Alexa647) (rose) et des noyaux par le DAPI (bleu), imagées par microscopie confocale. L'anticorps utilisé sur la coupe CDAHFD est le rat anti-souris CD31 (Cat550274 BD Pharmingen™), et celui utilisé sur la coupe SD est le rat anti-souris CD31 de thermofisher. Barre d'échelle : 50 μ m.

Un immuno-marquage du CD31, une glycoprotéine membranaire utilisée comme marqueur des cellules endothéliales, a été réalisé sur les coupes de souris SD. Sur la Figure 102.a, on observe le signal du CD31 autour des vaisseaux permettant de visualiser les cellules endothéliales ayant une forme allongée, un cytoplasme peu abondant et un noyau aplati. Ce signal est absent du parenchyme hépatique mais également des cellules endothéliales sinusoïdales. En effet, le CD31 est exprimé par les cellules endothéliales des artères et artérioles, des veines et veinules, mais pas des capillaires sinusoïdaux (Poisson et al., 2017). Le seul anticorps ayant donné un signal satisfaisant sur les coupes des souris SD n'étant plus disponible chez les fournisseurs, nous avons testé un nouvel anticorps. Ce dernier donnait un marquage très faible sur les coupes de foie, comme on peut le voir sur une coupe hépatique de souris CDAHFD (Figure 102.b). Par conséquent, nous n'avons pas pu utiliser ce marqueur pour la suite des expériences d'immunohistochimie.

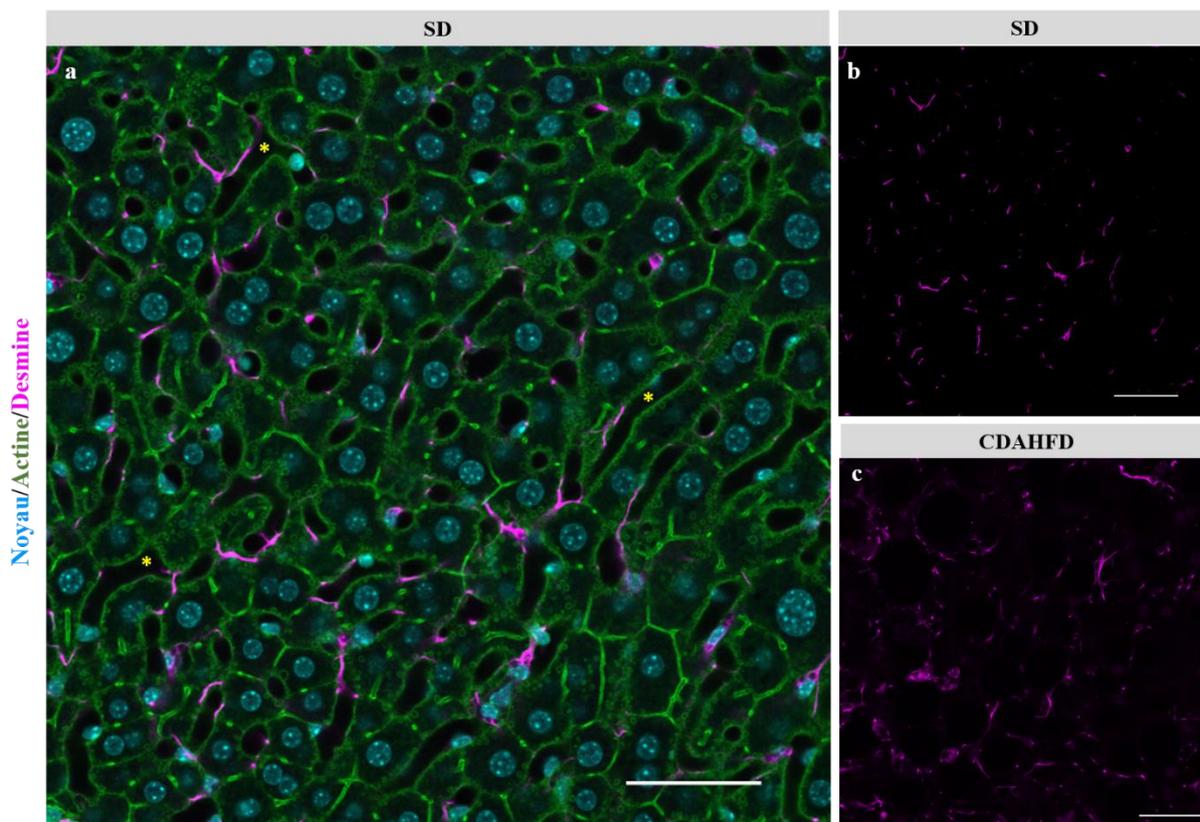


Figure 103 : Visualisation des cellules stellaires hépatiques sur des coupes de foie de souris SD et CDAHFD.

a) Superposition des signaux de la desmine (rose), de la phalloïdine-FITC (vert) et du DAPI sur une coupe de foie de souris SD. b et c) : Coupes de souris SD (b) ou CDAHFD (c) après marquage de la desmine (anticorps secondaire couplé à un Alexa647) (rose). Les coupes sont imagées par microscopie confocale. (Etoiles : sinusoides). Barre d'échelle : 50 µm.

Afin de bien visualiser la localisation des cellules stellaires dans le tissu hépatique, un co-marquage de la desmine et de l'actine (par la phalloïdine-FITC) a été réalisé sur les coupes de foie de souris SD. Sur la Figure 103.a, on observe le signal lié à la desmine au niveau péri-sinusoidal (en rose), ce qui est cohérent avec ce qui a été observé sur les coupes en paraffine. Si on compare le signal de la desmine seule sur les coupes de foie de souris SD (Figure 103.b), et celles des souris CDAHFD (Figure 103.c), on remarque que le signal est plus fréquent sur les coupes hépatiques des souris CDAHFD et est concentré dans certaines zones du tissu, suggérant une prolifération des cellules stellaires hépatiques dans ces zones.

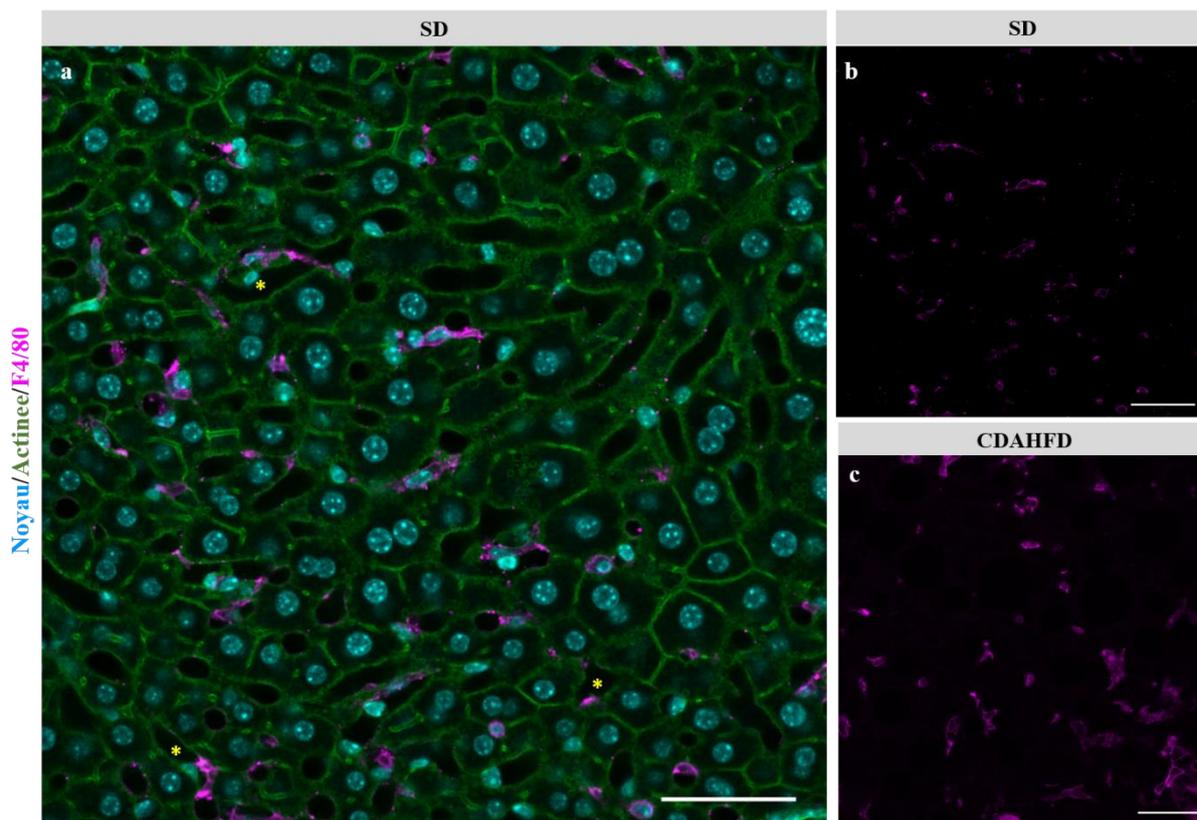


Figure 104 : Visualisation des cellules de Kupffer sur des coupes de foie de souris SD et CDAHFD.

a) Superposition des signaux du F4/80 (rose) de la phalloïdine-FITC (vert) et des noyaux marqués au DAPI sur une coupe de foie de souris SD. b et c : Coupes de souris SD (b) ou CDAHFD (c) après marquage du F4/80 (anticorps secondaire couplé à un Alexa647) (rose). Les coupes sont imagées par microscopie confocale. (Étoiles : sinusoides). Barre d'échelle : 50 µm.

De la même manière, un co-marquage du F4/80 et de l'actine par la phalloïdine-FITC a été effectué sur les coupes hépatiques de souris SD, afin d'observer les cellules de Kupffer. On remarque sur la Figure 104.a que le signal lié au F4/80 est observé dans les sinusoides, entre les lames d'hépatocytes, caractéristique de la localisation des cellules de Kupffer. Ce marquage permet de bien visualiser la morphologie de ces cellules phagocytaires possédant des noyaux ovalaires. Un marquage du F4/80 a également été réalisé sur les coupes de souris CDAHFD. La Figure 104.c montre que le signal du F4/80 est plus intense dans le foie fibrotique, comparé à un foie sain (Figure 104.b).

Pour tous les marquages réalisés précédemment, un témoin négatif, sans anticorps primaire, a été réalisé pour chaque condition et n'a pas donné de marquage, confirmant que les signaux observés sont bien spécifiques des anticorps utilisés.

Ces expériences d'immunohistochimie ont permis à la fois de bien caractériser le tissu hépatique des souris SD et CDAHFD sur des coupes réalisées au vibratome et de valider les différents marqueurs de cellules hépatiques, notamment les hépatocytes,

les cellules de Kupffer et les cellules stellaires. Ces différents marqueurs seront utilisés pour étudier l'internalisation des siRNA par les différents types de cellules hépatiques.

1.3.2.2 Efficacité d'administration des siRNA dans le tissu hépatique

Dans un premier temps, la distribution des siRNA a été étudiée dans un foie sain. Pour cela, trois formulations différentes de lipoplexes, contenant des siRNA-Alexa647, ont été administrées en IV à trois souris SD : le DMAPAP/DOPE, le liposome classiquement utilisé dans notre laboratoire, et les liposomes DMAPAP/DOPE/Chol et DMAPAP/DOPE/Chol/Cer PEG, qui ont présenté, en cytométrie, une internalisation importante dans les HSCs (16 et 30% respectivement). Deux heures après l'injection, les souris sont perfusées avec du PFA 4%, et le foie est prélevé et coupé au vibratome. Afin d'étudier le pourcentage de cellules ayant internalisé les siRNA, un marquage des noyaux est réalisé. Un exemple d'image obtenue pour chaque formulation est illustré dans la Figure 105.

Un signal de fluorescence ponctiforme (en rose) est observé sur les coupes hépatiques des souris SD injectées avec les différentes formulations (Figure 105). Ce signal caractéristique des siRNA fluorescents est absent des coupes hépatiques des souris non injectées (Figure 105). Le signal de fluorescence lié au siRNA-Alexa647 est localisé principalement au niveau des sinusoides et plus rarement dans le parenchyme hépatique, et ce indépendamment de la formulation testée. La fréquence ainsi que l'intensité du signal sont relativement similaires sur les coupes hépatiques des deux souris injectées avec les formulations DMAPAP/DOPE et DMAPAP/DOPE/Chol. En effet, la quantification du nombre de patchs de fluorescence associée au siRNA par champ microscopique (n= 3-5 champ par coupe) a montré que le ratio (nb de patchs de fluorescence associée siRNA/100 cellules) est de 37% pour le DMAPAP/DOPE et de 35% pour le DMAPAP/DOPE/Chol. Cependant, un signal plus fréquent du siRNA est observé avec la formulation DMAPAP/DOPE/Chol/Cer PEG (ratio = 51%).

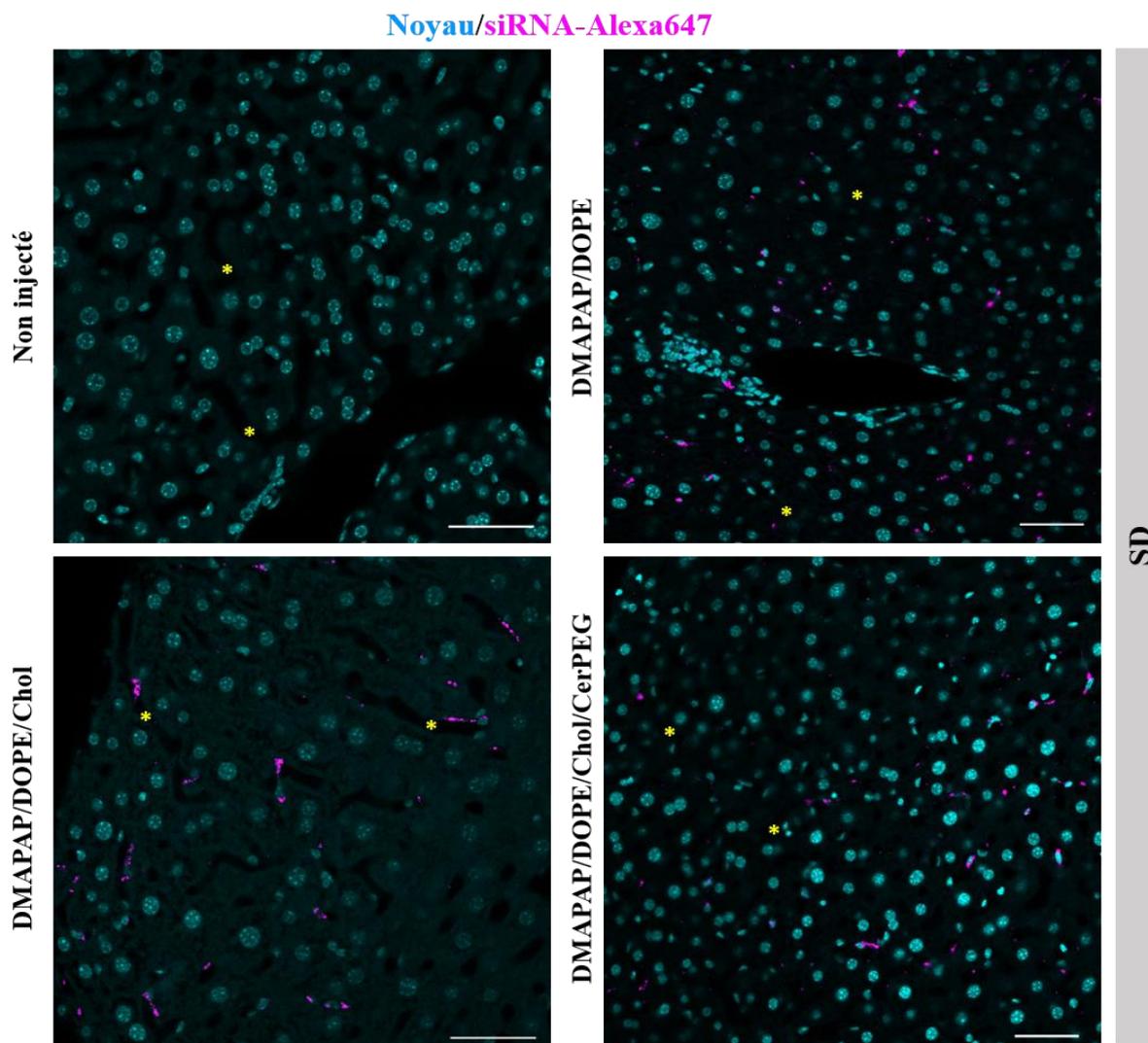


Figure 105 : Etude de la distribution des siRNA fluorescents dans le foie des souris SD après une injection IV des différentes formulations.

Coupes de foie de souris SD, deux heures après l'injection des différentes formulations de lipoplexes contenant des siRN-Alexa647 (rose) (dose du siRNA = 1mg/kg), et imagées par microscopie confocale. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu) (Etoiles : sinusoides). Barre d'échelle : 50 μ m.

Afin d'étudier la distribution des siRNA fluorescents dans un foie fibrotique et de déterminer si cette distribution est similaire à celle observée dans un foie sain, des souris CDAHFD ont également été injectées avec les trois formulations précédentes (DMAPAP/DOPE, DMAPAP/DOPE/Chol et DMAPAP/DOPE/Chol/Cer PEG). De plus, deux autres formulations ont également été testées : le DMAPAP/DOPE/CerPEG et le DMAPAP/DOPE/Chol/C14 PEG. De la même manière que les souris SD, les souris CDAHFD ont été perfusées et les foies prélevés et coupés à l'aide du vibratome. Un exemple de coupe hépatique de souris CDAHFD injectées avec les différentes formulations est illustré dans la Figure 106. Les noyaux sont marqués au DAPI.

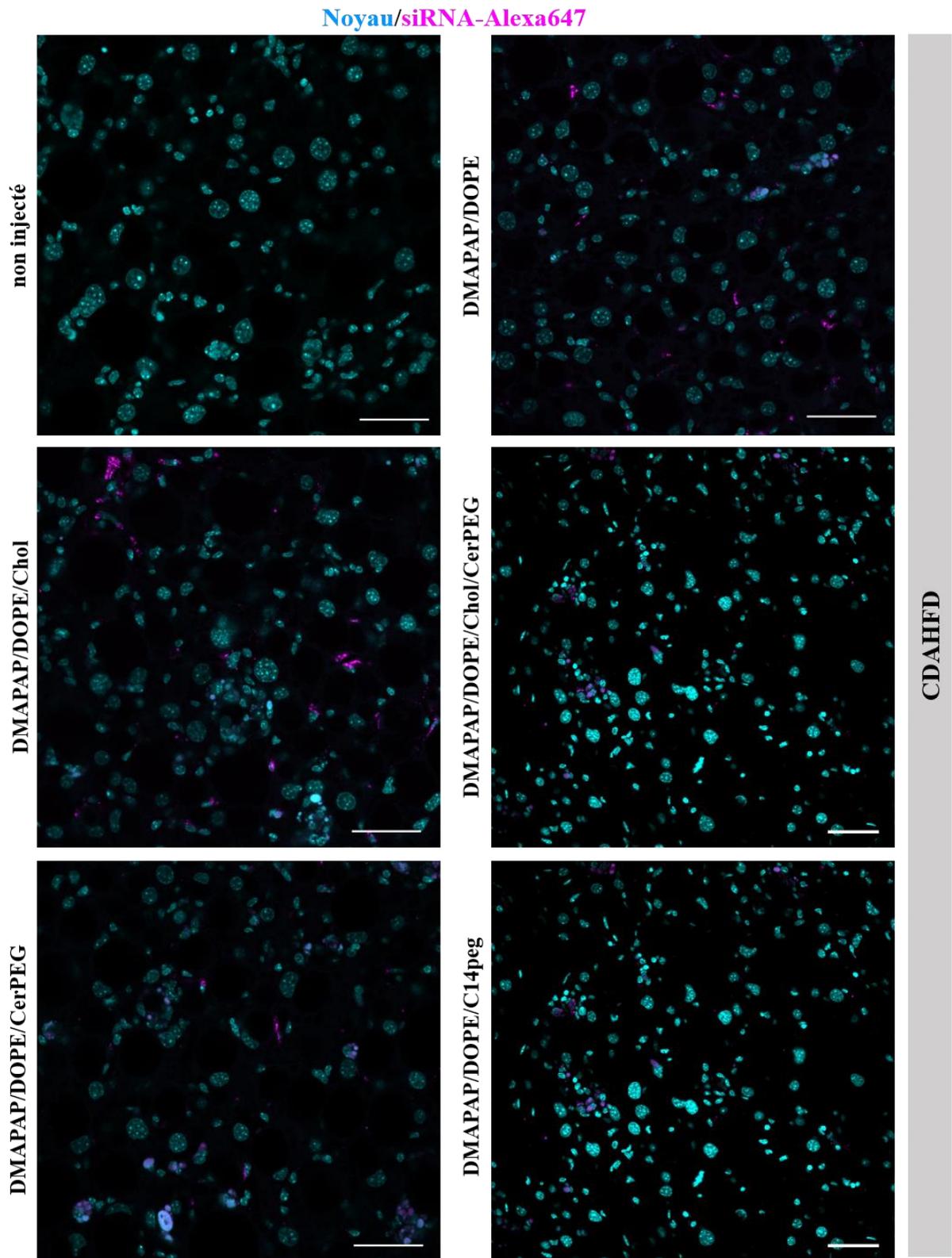


Figure 106 : Etude de la distribution des siRNA fluorescents dans le foie des souris CDAHFD après une injection IV des différentes formulations.

Coupes de foie de souris CDAHFD, deux heures après l'injection des différentes formulations de lipoplexes contenant des siRNA-Alexa647 (rose) (dose du siRNA = 1mg/kg), imagées par microscopie confocale. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Barre d'échelle : 50 μ m.

Comme pour les souris SD, le signal de fluorescence lié au siRNA est absent des coupes de souris CDAHFD non injectées. Cependant, contrairement à ce qui a été observé précédemment, la fréquence ainsi que l'intensité du signal de fluorescence observé sont différentes selon la formulation testée. Les coupes de foie de la souris injectée avec la formulation DMAPAP/DOPE/Chol présentent un signal de siRNA plus fréquent et d'intensité plus élevée par rapport aux quatre autres formulations, comme on peut l'observer sur la Figure 106. En effet, le ratio du nombre de patchs de fluorescence associée au siRNA par 100 cellules hépatiques est de 45%, en utilisant cette formulation. Les coupes hépatiques de la souris injectée avec la formulation DMAPAP/DOPE présentent un ratio relativement plus élevé (26%) que celui des formulations DMAPAP/DOPE/CerPEG (12%), et DMAPAP/DOPE/C14PEG (17%). Enfin, le signal du siRNA sur les coupes de foie de la souris CDAHFD injectée avec la formulation DMAPAP/DOPE/Chol/CerPEG est très faible et très rare (ratio = 6%), tandis qu'il était plus fréquent (51%) et plus intense sur les coupes de foie de la souris témoin injectée avec la même formulation.

FORMULATION	SD	CDAHFD
DMAPAP/DOPE	37%	26%
DMAPAP/DOPE/Chol	35%	45%
DMAPAP/DOPE/Chol/cer PEG	51%	6%
DMAPAP/DOPE/cer PEG	-	12%
DMAPAP/DOPE/C14 PEG	-	17%

Tableau 15 : Quantification de l'administration des siRNA dans le tissu hépatique.

Ratio du nombre de patchs de fluorescence associée au siRNA-Alexa647 par 100 cellules, dans le tissu hépatique des souris SD et CDAHFD, en fonction des différentes formulations de lipoplexes injectées

En résumé, la distribution des siRNA sur les coupes hépatiques est différente entre les souris SD et CDAHFD, pourtant injectées avec les mêmes formulations de lipoplexes (Tableau 15). En effet, la distribution des siRNA dans un foie sain est similaire pour les deux formulations, DMAPAP/DOPE et DMAPAP/DOPE/Chol, tandis qu'une distribution plus importante est observée en utilisant la formulation DMAPAP/DOPE/Chol/CerPEG. En revanche, chez les souris CDAHFD injectées avec les différentes formulations, le liposome DMAPAP/DOPE/Chol semble présenter la plus importante efficacité d'internalisation des siRNA par les cellules hépatiques.

1.3.2.3 Répartition des siRNA dans les cellules hépatiques

Afin d'étudier la répartition des siRNA dans les différents types de cellules hépatiques en fonction des formulations utilisées, des marquages du F4/80 et de la desmine ont été réalisés sur les coupes de foie des souris CDAHFD injectées avec les différentes formulations. J'ai choisi de présenter uniquement les résultats obtenus avec les formulations les plus intéressantes.

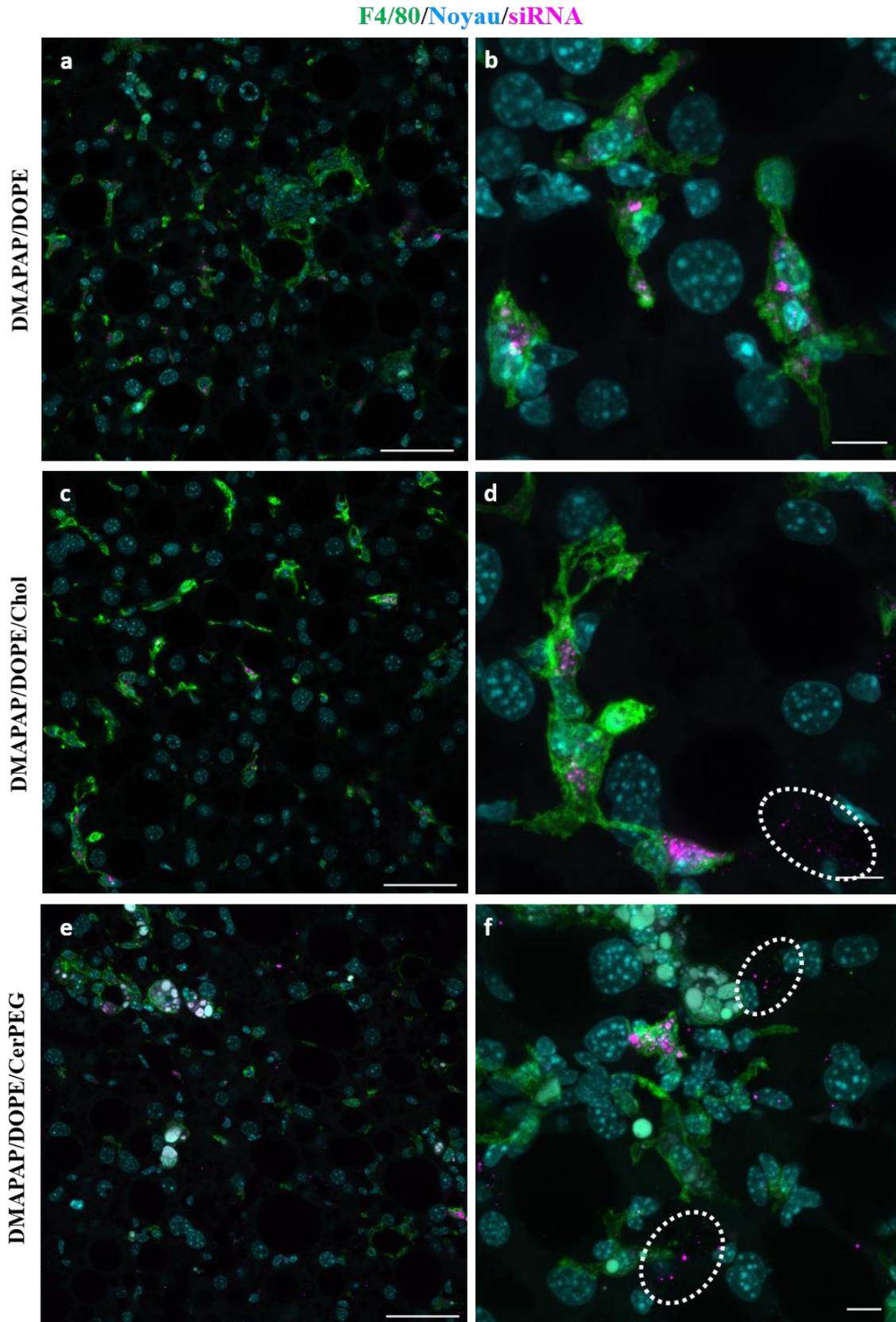


Figure 107 : Etude de la répartition des lipoplexes dans les cellules de Kupffer.

Coupes de foie de souris CDAHFD deux heures après l'injection IV des différentes formulations de lipoplexes contenant des siRNA-Alexa647, puis marquage du F4/80 (anticorps secondaire couplé à un Alexa488). Les noyaux sont marqués au DAPI. Cercles : signal du siRNA non associé au F4/80. Barre d'échelle : panneau de gauche : 50 µm, panneau de droite : 20 µm.

Après marquage du F4/80, une colocalisation du signal de fluorescence du siRNA-Alexa647 et celui du F4/80-Alexa488 est observée sur les coupes de foie des souris CDAHFD, quelle que soit la formulation injectée (Figure 107.a, c, e). On peut observer sur les zooms illustrés à droite que le signal lié au marquage du F4/80-Alexa488 entoure étroitement le signal associé au siRNA-Alexa647 (Figure 107.b, d, f). Ces résultats montrent que les lipoplexes de siRNA sont majoritairement internalisés par les cellules de Kupffer, probablement en raison de leur forte capacité à phagocyter les particules exogènes. Cependant, avec les trois formulations, un signal du siRNA-Alexa647 est également observé dans certaines zones, non associé au F4/80 (cercles, Figure 107), signe d'une internalisation des lipoplexes de siRNA par d'autres types de cellules hépatiques.

Un marquage de la desmine a ensuite été réalisé afin de déterminer si les lipoplexes sont également internalisés par les HSCs. Une colocalisation du signal de fluorescence du siRNA-Alexa647 et de celui de la desmine-Alexa488 est observée sur certaines zones des coupes hépatiques de souris injectées avec les formulations DMAPAP/DOPE, DMAPAP/DOPE/Chol et DMAPAP/DOPE/Cer PEG (cercles, Figure 108.a, c, e). Cette colocalisation est plus fréquente sur les coupes hépatiques de la souris injectée avec la formulation DMAPAP/DOPE/Chol indiquant une éventuelle internalisation des siRNA par les cellules stellaires (Figure 108.c). Un exemple plus zoomé, pour chaque formulation, du marquage de la desmine entourant le signal ponctiforme du siRNA-Alexa647 est illustré dans la Figure 108 (panneau de droite). Cependant, comme la desmine est un filament intermédiaire, le signal lié à son marquage est très fin, il est donc difficile de déterminer avec certitude si les siRNA sont bien à l'intérieur de la cellule stellaire ou s'ils sont internalisés par une cellule adjacente. De plus, les cellules de Kupffer présentent une localisation très proche des HSCs, on ne peut donc pas écarter l'hypothèse que les siRNA soient internalisés par une cellule de Kupffer qui serait à proximité de la cellule stellaire. Un co-marquage des cellules de Kupffer et des HSCs devrait être réalisé mais nécessiterait une bonne combinaison des marqueurs et des fluorophores. Il serait également intéressant de réaliser une dissociation enzymatique *in situ* du foie des souris injectées avec les lipoplexes contenant les siRNA fluorescents, et d'obtenir une préparation de cellules hépatiques sur laquelle un co-marquage de la desmine et du F4/80 sera réalisé. Une mise au point de ces deux techniques est actuellement en cours par notre équipe.

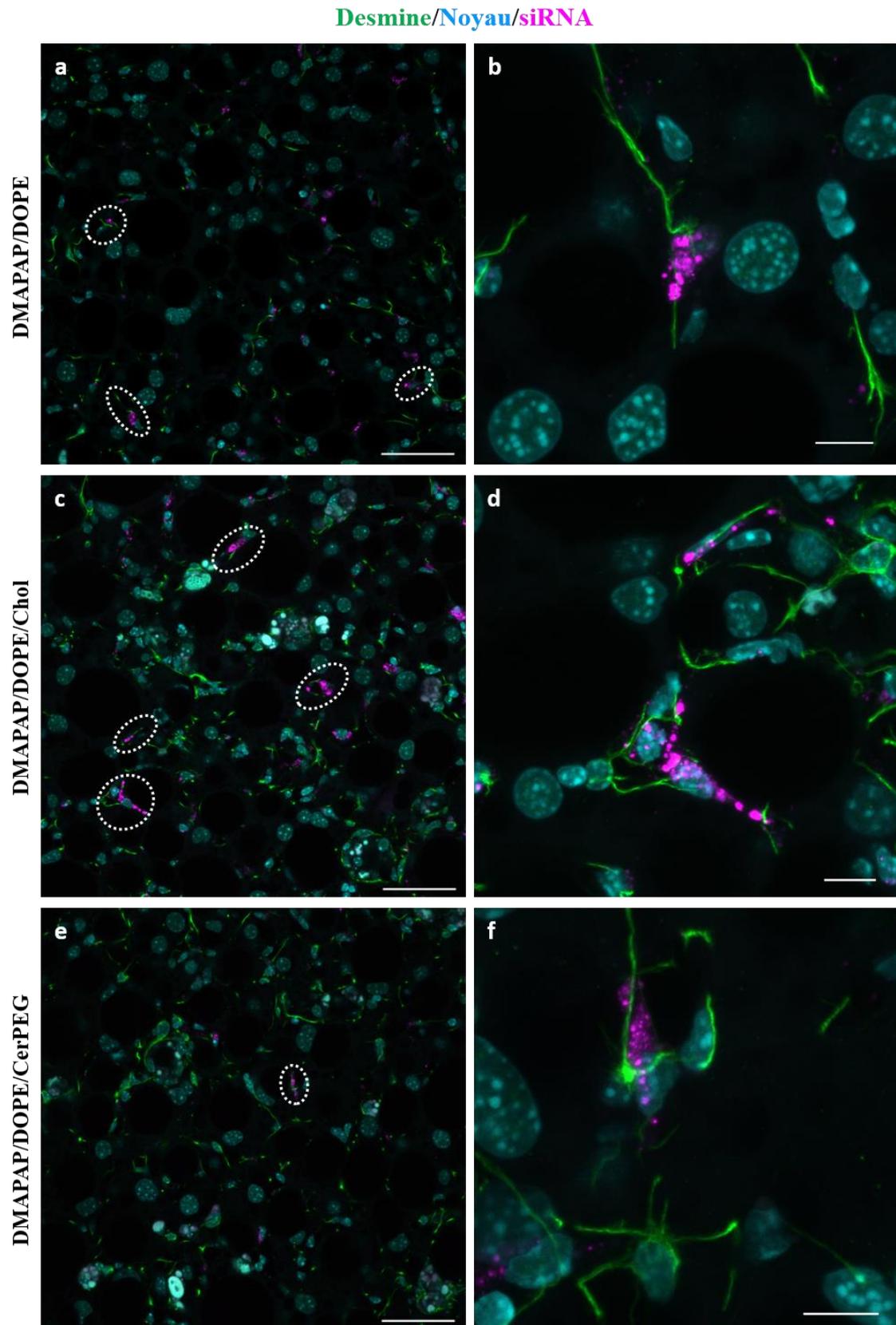


Figure 108 : Etude de la répartition des lipoplexes dans les cellules stellaires.

Coupes de foie de souris CDAHFD deux heures après l'injection IV des différentes formulations de lipoplexes contenant des siRNA-Alexa647, puis marquage de la desmine (anticorps secondaire couplé à un Alexa488). Les noyaux sont marqués au DAPI. Cercles : colocalisation du signal de la desmine-Alexa488 et de celui du siRNA-Alexa647. Barre d'échelle : panneau de gauche : 50 μm, panneau de droite : 20 μm.

L'étude de la répartition des siRNA dans les différents types de cellules hépatiques nous a permis de sélectionner une formulation : le DMAPAP/DOPE/Chol qui semble être la plus efficace, parmi celles testées, pour une administration des siRNA aux cellules stellaires dans un foie fibrotique. Cette formulation a été choisie afin de vectoriser les siRNA dirigés contre le collagène et d'évaluer par la suite l'efficacité thérapeutique de ces vecteurs dans le modèle CDAHFD de souris.

Ces résultats sont à prendre avec précaution puisque l'étude de la distribution des siRNA pour chaque formulation a été réalisée sur une seule souris. Par manque de temps, nous n'avons pas pu augmenter le nombre d'animaux injectés. Une étude plus poussée est nécessaire afin de confirmer ces résultats. De plus, les différentes formulations ont été administrées à des souris à différentes semaines de régime CDAHFD (entre 6 et 12 semaines), présentant ainsi des degrés plus ou moins importants de fibrose. Il est clair que la forte accumulation des fibres de collagène, à des temps longs de régime, peut avoir un effet sur la distribution des siRNA dans le tissu hépatique. Il est donc nécessaire de reproduire l'expérimentation sur des souris CDAHFD à la même semaine de régime.

2. Etude de l'efficacité d'inhibition des siRNA anti-collagène 1 *in vitro*

La cible moléculaire choisie pour l'inhibition de la fibrose hépatique est le collagène de type 1. Ce collagène est le composant le plus abondant de la MEC pathologique lors de la fibrose hépatique. Il est composé de deux chaînes $\alpha 1$ codées par le gène *COL1A1* et une chaîne $\alpha 2$ codée par le gène *COL1A2* (Bhogal et al., 2005). Plusieurs études ont montré que l'inhibition de l'expression du collagène ou de certaines protéines liées à son expression, permet la régression de la fibrose hépatique et l'amélioration des caractéristiques pathologiques de la maladie. Cependant, cela a été étudié uniquement dans des modèles animaux tels que CCl_4 ou BDL, qui sont peu représentatifs des maladies hépatiques métaboliques. Cette étude a donc pour but d'inhiber l'expression du collagène, en utilisant des siRNA dans le modèle murin CDAHFD.

2.1 Identification des séquences de siRNA anti-collagène 1

Six séquences de siRNA dirigées contre col1 α 1 de souris ont été identifiées. Trois séquences sont issues de la littérature (1, 2 et 3), les trois suivantes (4, 5 et 6) ont été désignées par la société Eurogentec à partir de la séquence cible (NM_007742.3 NCBI). Les séquences de ces six siRNA, ainsi que la position de leur séquence cible sur l'ARNm sont représentées dans la Figure 109.

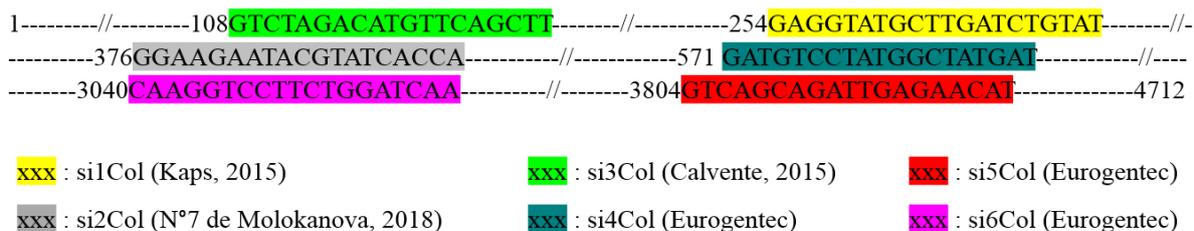


Figure 109 : Position des six séquences de siRNA testées sur l'ARNm du collagène 1 α 1 de souris.

Les séquences 1, 2 et 3 ont été identifiées dans la littérature. Les séquences 4, 5 et 6 ont été conçues par Eurogentec.

Chaque séquence de siRNA a été formulée avec le liposome DMAPAP/DOPE pour former les lipoplexes. Les différents siRNA ont été testés à la fois sur les cellules B16, qui est le modèle cellulaire classiquement utilisé dans notre laboratoire, et sur les fibroblastes 3T3. L'expression du collagène a été évaluée par Western Blot, après transfection des cellules par des lipoplexes contenant soit une des six séquences de siRNA testées, soit un siRNA non spécifique (contrôle). Cependant, du fait de la nature du collagène et de sa capacité à polymériser, il est très difficile de quantifier efficacement la protéine en western blot. Nous n'avons pas réussi à détecter avec assez de précision et de reproductibilité le niveau d'expression du collagène dans les cellules transfectées et non transfectées. Un marquage par immunocytofluorescence a également été réalisé sur les cellules transfectées, en utilisant un anticorps dirigé contre Col1 α 1 mais l'anticorps utilisé n'a pas permis d'obtenir un signal satisfaisant.

Cependant, nous avons remarqué que les cellules transfectées avec certains siRNA anti col1 α 1 se détachent de la plaque de culture, mais ce n'est pas le cas des cellules transfectées avec le siRNA contrôle. Le collagène étant une molécule permettant l'adhésion des cellules au support plastique, cette observation pourrait indiquer un certain degré d'extinction de l'expression du collagène. Mais cela signifierait également que les cellules efficacement transfectées se détachent et les cellules pour qui la transfection n'a pas été efficace restent attachées à la plaque de culture. Hors, lors de l'analyse, ce sont ces cellules qui sont analysées pour l'expression du collagène.

2.2 Mise en place d'un modèle d'étude de l'efficacité d'interférence des siRNA

En raison des problèmes techniques décrits ci-dessus, nous avons conçu un modèle cellulaire nous permettant d'évaluer l'efficacité des séquences de siRNA *in vitro*. Ce modèle consiste à transfecter des cellules B16 avec des lipoplexes contenant une construction plasmidique codant une protéine de fusion composée de la molécule du collagène de type 1 (Col1 α 1) liée à l'étiquette myc. Ces mêmes lipoplexes contiennent également un siRNA dirigé contre Col1 α 1 ou un siRNA non spécifique (contrôle). 48h après la transfection des cellules B16 par ces lipoplexes, un immuno-marquage est réalisé en utilisant un anticorps anti-myc. Ainsi, les cellules transfectées avec le plasmide Col-myc et un siRNA non spécifique, présenteront un signal important associé à l'étiquette myc, puisque la protéine de fusion est exprimée, et celles transfectées avec le plasmide Col-myc et un siRNA dirigé contre Col1 α 1 présenteront un signal lié au marquage de myc variable selon l'efficacité du siRNA. Une quantification est ensuite réalisée afin de déterminer le pourcentage de cellules exprimant la protéine Col-myc et comparer les efficacités d'inhibition obtenues avec chaque séquence de siCol par rapport au siRNA contrôle (siCtrl). Un schéma illustrant le modèle cellulaire développé est présenté dans la Figure 110.

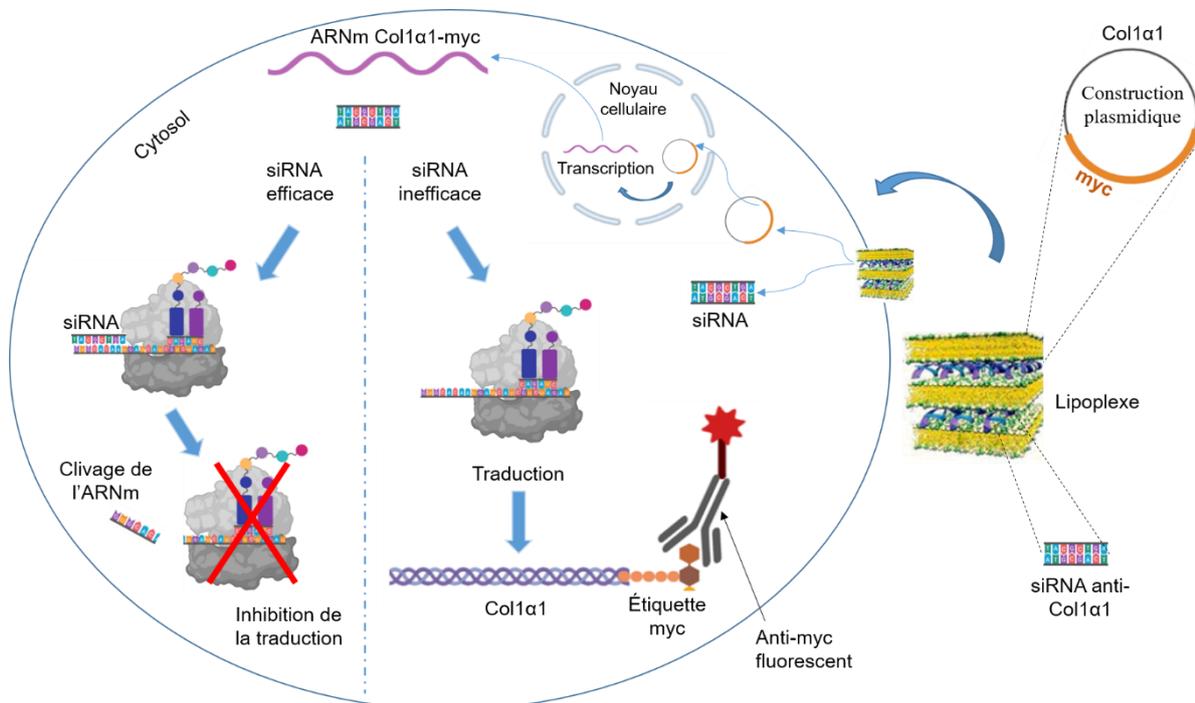


Figure 110 : Modèle cellulaire de validation des séquences de siRNA.

Ce modèle cellulaire peut être appliqué pour l'évaluation de l'efficacité des siRNA dirigés contre n'importe quel ARNm, il convient alors de cloner le gène codant la protéine d'intérêt dans la construction plasmidique.

Afin de comparer l'efficacité d'inhibition des six siRNA, les cellules B16 ont été transfectées avec le plasmide Col-myc (0,3 µg) et les différentes séquences de siCol (0,3 µg) pendant 48h. Les pourcentages d'inhibition de l'expression de la protéine Col-myc sont calculés par rapport aux cellules transfectées avec le plasmide Col-myc et un siCtrl. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 111.

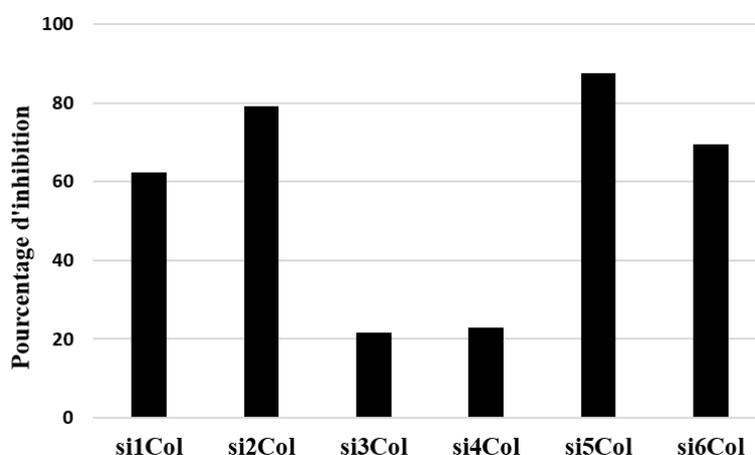


Figure 111 : Validation des séquences de siRNA dirigés contre Col1a1.

Efficacité d'inhibition de l'expression de la protéine de fusion Col-myc par les six siCol testés, 48h après transfection des cellules B16 par des lipoplexes contenant le plasmide Col-myc et l'un des six siRNA dirigés contre le Col1 α 1 ou un siRNA non spécifique. La quantification a été réalisée après immunocytofluorescence sur les cellules transfectées, en utilisant un anticorps spécifique de myc. (n = 5 images quantifiées par condition).

Les séquences si3Col et si4Col présentent une faible efficacité d'inhibition qui ne dépasse pas 20%. En revanche, une inhibition d'environ 80% est observée avec les séquences de si2Col et si5Col. Les séquences si1Col et si6Col présentent une efficacité d'inhibition de la protéine Col-myc d'environ 60%.

2.3 Mise en place d'un modèle *in vitro* d'activation des HSCs

Afin de tester les séquences de siRNA anti col1 α 1 sur les cellules ciblées chez l'animal, nous avons mis en place des cultures primaires de cellules stellaires. Pour cela, des préparations de cellules hépatiques sont réalisées à partir de plusieurs dissociations enzymatiques *in situ* de foie des souris SD. Les HSCs primaires sont ensuite purifiées par centrifugation sur un gradient de Nycodenz (voir Matériels et méthodes). Le comptage des cellules est effectué au microscope optique, en lumière blanche. La dissociation d'un foie de souris SD permet de produire entre 300.000 et 500.000 cellules stellaires. Grâce à l'auto-fluorescence des

gouttelettes de rétinoïdes présentes dans les cellules stellaires, le pourcentage de HSCs peut être estimé en comptant au microscope les cellules présentant une auto-fluorescence après excitation par un laser ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$), et est compris entre 30 et 60%.

2.3.1 Suivi morphologique des HSCs en culture

Afin de mimer *in vitro* l'activation des cellules stellaires, les HSCs sont mises en culture sur un support plastique permettant leur transformation en myofibroblastes. En effet, les HSCs quiescentes sont connues pour se différencier spontanément en myofibroblastes en 7 à 10 jours, si elles sont cultivées sur un support plastique, qui agit comme un signal d'activation de ces cellules. Afin de suivre leur transformation phénotypique, les HSCs obtenues sont réparties sur une plaque 48 puits, puis observées après 24h, 48h et 8 jours de mise en culture.

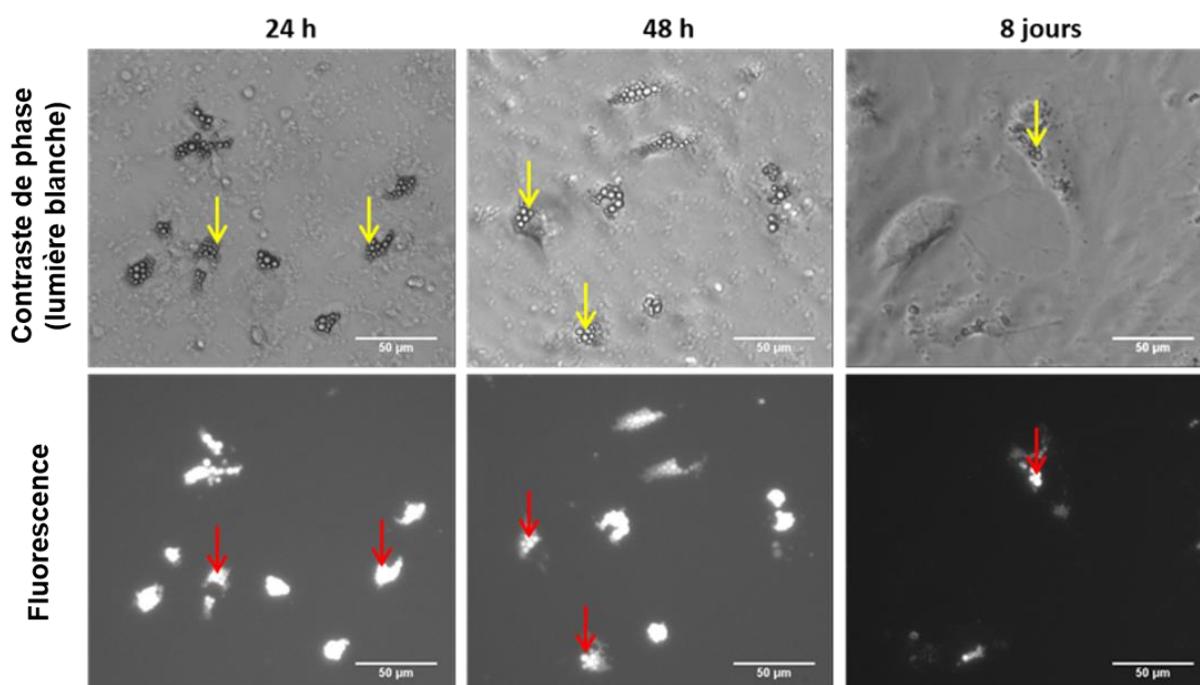


Figure 112 : Suivi morphologique des cellules stellaires hépatiques.

Images de cellules stellaires primaires de souris après 24h, 48h et 8 jours de mise en culture par microscopie à contraste de phase (A), et après excitation par un laser ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$) (B). Flèches jaunes : HSCs, flèches rouges : fluorescence des gouttelettes de rétinoïdes. Barre d'échelle : 50 μm .

Après 24h et 48h de mise en culture, les cellules conservent leur forme étoilée avec de nombreuses gouttelettes de rétinoïdes visibles au microscope à contraste de phase (Figure 112). Ces gouttelettes présentent un signal de fluorescence élevé après excitation par un laser UV (Figure 112). Cependant, après 8 jours de mise en culture, on constate que les cellules ont perdu leur morphologie caractéristique, deviennent plus étalées et possèdent moins de gouttelettes de rétinoïdes. Le signal de fluorescence de ces gouttelettes est plus faible (Figure 112).

Ces résultats confirment que les cellules stellaires primaires subissent une transformation morphologique et perdent leurs gouttelettes de rétinoïdes après 8 jours de mise en culture sur un support plastique.

2.3.2 Caractérisation des HSCs primaires en culture

Afin de mieux caractériser les HSCs en culture, des marquages par immunocytofluorescence de la desmine et du cRBP1 sont réalisés sur des HSCs primaires après 24h ou 7 jours de mise en culture.

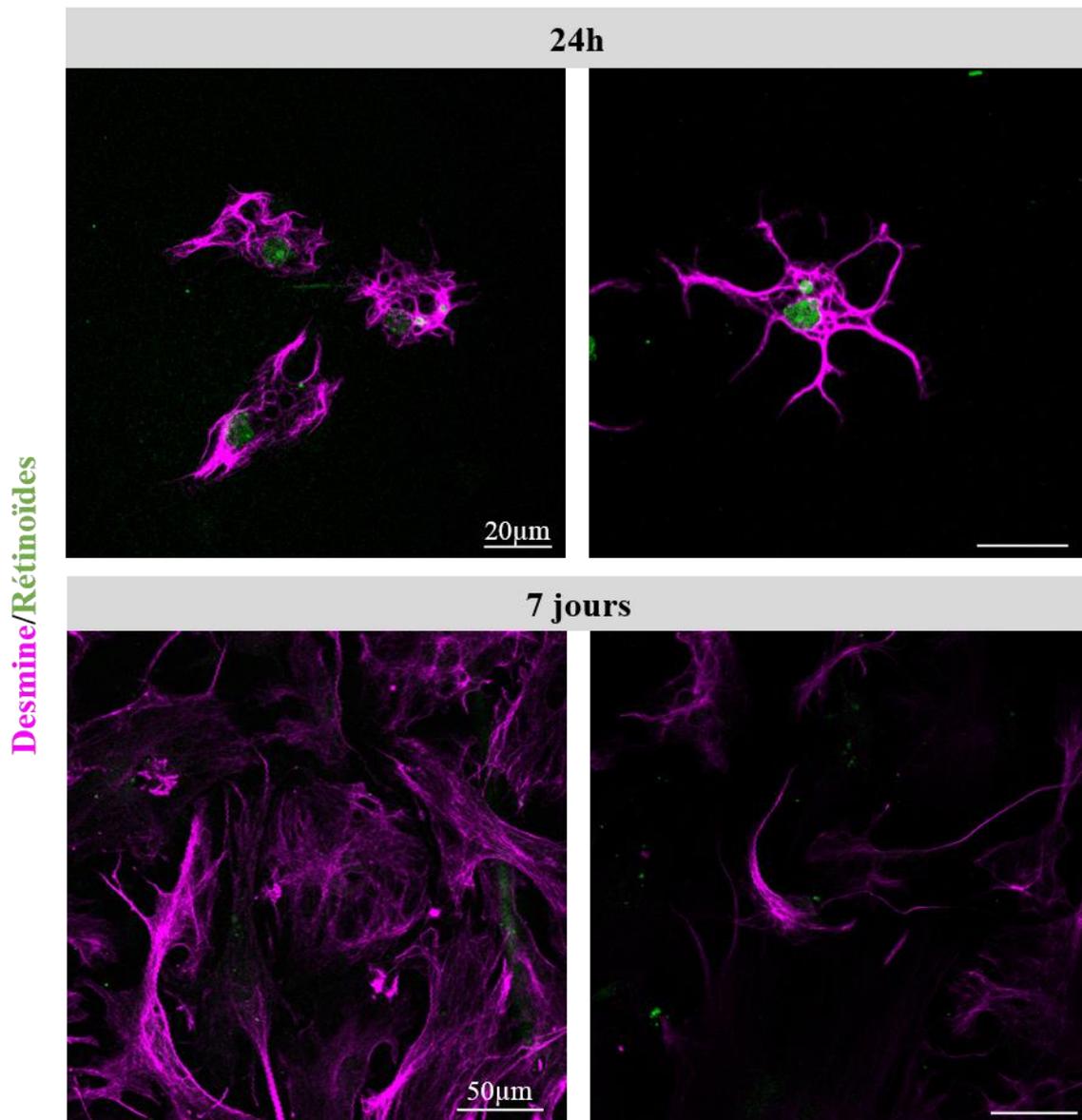


Figure 113 : Caractérisation par immunofluorescence de l'expression de la desmine par les HSCs primaires de souris en culture.

Cellules stellaires primaires de souris SD après 24h ou 7 jours de mise en culture puis immunomarquage de la desmine, imagées par microscopie confocale. Signal de la desmine (anticorps secondaire couplé à un Alexa647) (en rose), le signal de fluorescence des rétinoïdes (en vert). Barre d'échelle : 20 µm (24h), 50 µm (7 jours).

Après 24h de mise en culture, les cellules stellaires expriment la desmine, visible en rose, permettant de bien visualiser leur forme étoilée avec de nombreux prolongements cytoplasmiques, et possèdent également de multiples gouttelettes de rétinoïdes (en vert) (Figure 113). Après 7 jours de mise en culture, les cellules conservent une forte expression de la desmine. Cependant, elles présentent une forme plus étalée, très peu de gouttelettes de rétinoïdes, et sont plus nombreuses, ce qui indique leur prolifération (Figure 113).

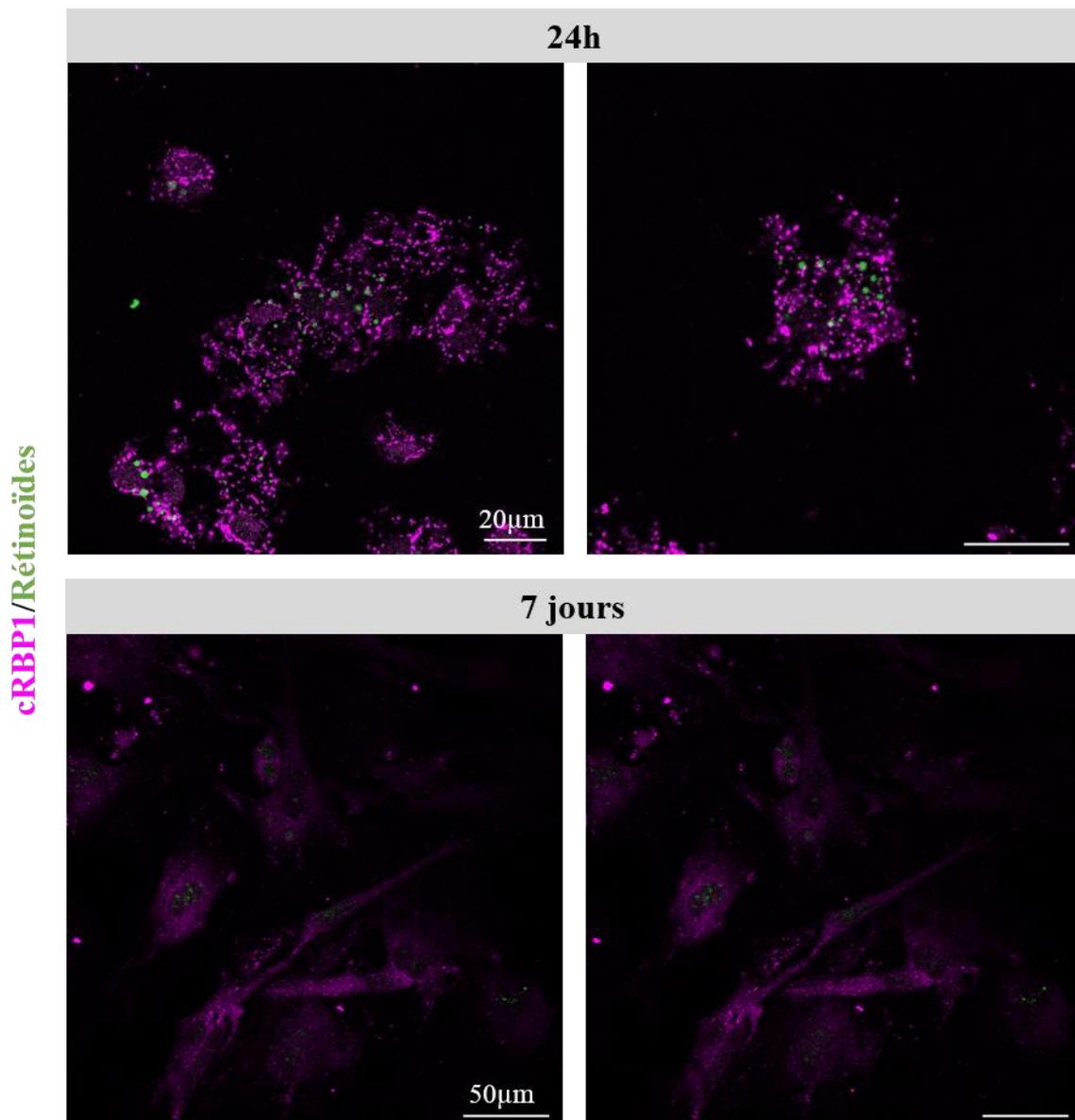


Figure 114 : Caractérisation par immunofluorescence de l'expression du cRBP1 par les HSCs primaires de souris en culture.

Cellules stellaires primaires de souris SD après 24h ou 7 jours de mise en culture puis immunomarquage du cRBP1, imagées par microscopie confocale. Signal du cRBP1 (anticorps secondaire couplé à un Alexa 647) (en rose), le signal de fluorescence des rétinoïdes (en vert). Barre d'échelle : 20 µm (24h), 50 µm (7 jours).

Le marquage du cRBP1 est très différent de celui de la desmine comme on peut l'observer sur la Figure 114. A 24h, les cellules stellaires présentent un signal ponctiforme associé au marquage du cRBP1 avec la présence de nombreuses gouttelettes de rétinoïdes. Ce signal

est présent à la fois dans le corps cellulaire mais également au niveau des prolongements cytoplasmiques. Bien que les cellules stellaires conservent l'expression du cRBP1 après 7 jours de mise en culture, le signal associé au marquage évolue. En effet, on ne retrouve pas le signal ponctiforme mais un signal beaucoup plus diffus et d'intensité plus faible comparé à celui observé à 24h (Figure 114).

Afin de déterminer si les cellules stellaires se sont dédifférenciées en myofibroblastes après 7 jours de mise en culture, un immunomarquage du α -SMA est réalisé. Un exemple des images obtenues est illustré dans la Figure 115.

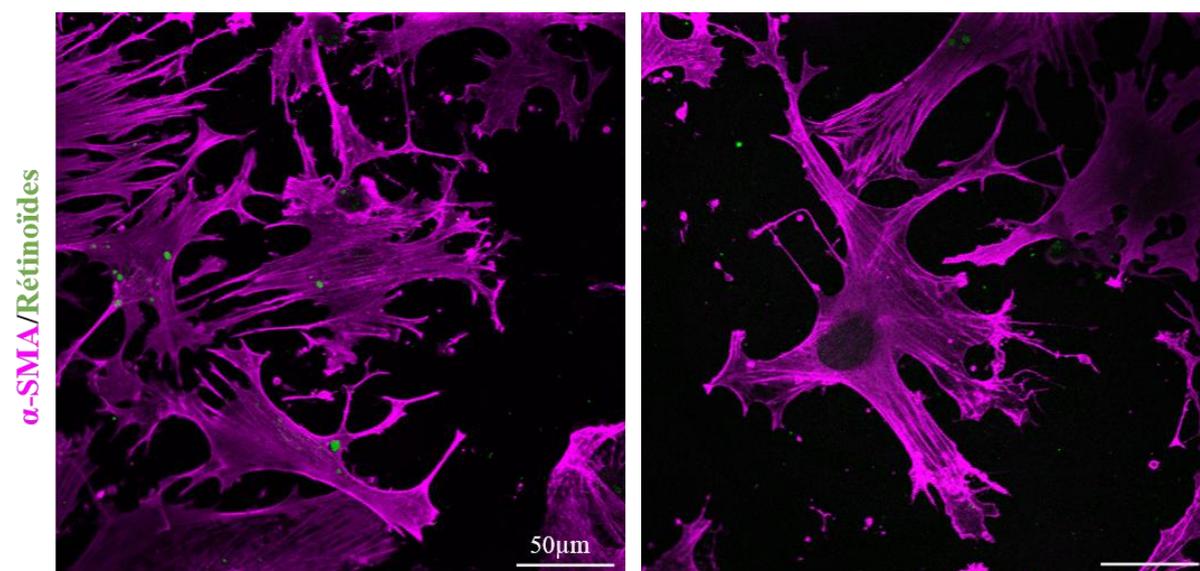


Figure 115 : Expression du α -SMA par les HSCs primaires après 7 jours de mise en culture.

Cellules stellaires primaires de souris SD après 7 jours de mise en culture puis immuno-marquage du α -SMA-Alexa647, imagées par microscopie confocale. Le signal du α -SMA (anticorps secondaire couplé à un Alexa 647) est visible en rose, les gouttelettes de rétinoïdes sont en vert. Barre d'échelle : 50 μ m.

Après 7 jours de mise en culture, les cellules stellaires présentent un fort signal lié au marquage du α -SMA. Ce signal est présent à la fois au niveau du cytoplasme, et est plus concentré au niveau des prolongements cellulaires. Il permet de mettre en évidence la forme étalée des cellules mises en culture. Certaines cellules stellaires présentent toujours des petites gouttelettes de rétinoïdes mais qui sont peu nombreuses.

Les expériences d'immunocytofluorescence ont montré que les cellules stellaires primaires isolées de foie de souris SD expriment la desmine et le cRBP1 et présentent de nombreuses gouttelettes de rétinoïdes. Après 7 jours de mise en culture, ces cellules perdent la majorité de leurs gouttelettes de rétinoïdes, conservent l'expression de la desmine tandis que l'expression du cRBP1 diminue. En plus de leur forme très étalée, ces cellules présentent une forte expression du α -SMA, signe de leur dédifférenciation en myofibroblastes.

2.3.3 Production de collagène par les HSCs primaires

Afin de déterminer si les cellules stellaires dédifférenciées en myofibroblastes présentent une augmentation de l'expression du collagène, nous avons réalisé un marquage par immunocytofluorescence sur les cellules stellaires après 7 jours de mise en culture, de la même manière que celui de la desmine et du α -SMA, en utilisant un anticorps dirigé contre Col1 α 1. Cependant, l'anticorps testé n'a pas permis d'obtenir un signal satisfaisant. Nous avons ensuite réalisé un Western Blot sur les lysats des cellules stellaires après 7 ou 14 jours de mise en culture, pour quantifier le collagène produit par les cellules stellaires dédifférenciées. Cependant, le nombre de cellules stellaires utilisées était très faible, et n'a pas permis d'obtenir un signal suffisamment élevé pour la quantification du collagène produit.

Nous avons donc changé de méthode et utilisé le Sirius Red pour quantifier le collagène produit par les cellules stellaires après 7 jours et 14 jours de mise en culture, par comparaison avec une gamme étalon de collagène (voir Matériels et méthodes). Les résultats sont présentés dans la Figure 116.

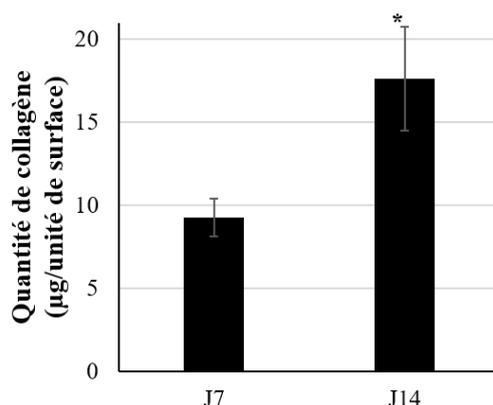


Figure 116 : Production de collagène par les HSCs primaires de souris.

Quantification par le Sirius Red du collagène produit par les HSCs primaires de souris après 7 ou 14 jours de mise en culture sur un support plastique. (n=5 pour J7 et n = 6 pour J14). * p < 0.005 Test de Mann-Whitney.

Après 7 jours de mise en culture la quantité de collagène produite est d'environ 9 µg/unité de surface. Cette quantité a presque doublé pour atteindre environ 18 µg/unité de surface, après 14 jours de mise en culture, confirmant l'augmentation de l'expression du collagène par les cellules stellaires primaires de souris après leur activation.

Cette méthode de quantification pourrait être utilisée pour évaluer l'efficacité d'inhibition des siCol sur les cellules stellaires activées. Une des expériences prévues était de transfecter les cellules stellaires mises en culture par les séquences de siCol validées précédemment, et de quantifier par la suite le collagène produit par les cellules transfectées. Par manque de temps et pour des raisons organisationnelles, cette

expérience n'a pas pu être réalisée. Une expérience a cependant été mise en place pour évaluer l'efficacité des séquences de siCol *in vivo*, dans le modèle CDAHFD.

3. Evaluation du potentiel thérapeutique des vecteurs de siRNA anti-collagène dans le modèle CDAHFD

Afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique des lipoplexes de siRNA dans le modèle CDAHFD de souris, nous avons choisi d'utiliser la formulation DMAPAP/DOPE/Chol pour la vectorisation des siRNA. Afin de cibler à différents endroits l'ARNm Col1 α 1, et d'obtenir éventuellement un effet synergique, un mélange des 3 séquences de siCol (séquences 2, 5 et 6) les plus efficaces *in vitro*, à des quantités équivalentes, a été utilisé pour la formation des lipoplexes. Un plasmide non codant a également été ajouté en tant qu'adjuvant anionique. La dose de siRNA injectée est de 1 mg/kg.

Les souris ont été soumises au régime CDAHFD et divisées en deux groupes de 8 souris injectées avec des lipoplexes contenant soit un siRNA contrôle (Ctrl), soit le mélange des trois siRNA dirigés contre Col1 α 1 et un groupe témoin de 6 souris injectées avec une solution de NaCl à 150 mM. Le poids ainsi que le comportement des souris ont été suivis trois fois par semaine. Des injections hebdomadaires ont été prévues de la 3^{ème} à la 9^{ème} semaine de régime, comme cela est décrit dans la Figure 117. Cependant, en raison du confinement lié à la COVID-19, les souris ont dû être sacrifiées après la 4^{ème} injection de lipoplexes, l'expérimentation a donc été interrompue et les résultats n'ont pas encore pu être exploités.

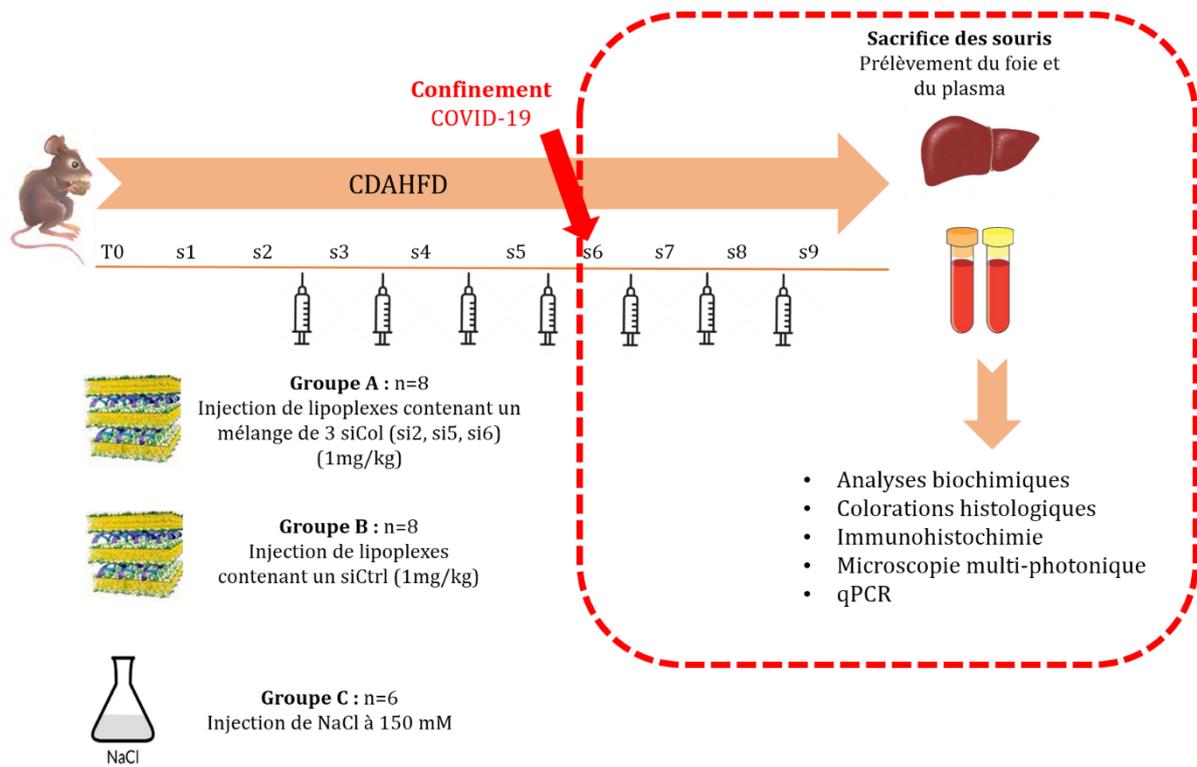


Figure 117 : Protocole expérimental pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique des vecteurs de siCol dans le modèle CDAHFD.

4. Conclusion

Dans cette étude, plusieurs formulations liposomales à base de lipide cationique DMAPAP et de lipide zwitterionique DOPE ont été préparées. Des lipides PEGylés ou du cholestérol ont également été ajoutés. L'efficacité de ces formulations pour l'administration des siRNA a été évaluée *in vitro*. Les lipoplexes PEGylés ont présenté des efficacités d'inhibition plus faibles *in vitro*. Cependant, l'étude de biodistribution des siRNA dans un foie sain a montré que l'ajout d'un lipide PEGylé ou du cholestérol permet d'éviter une internalisation des siRNA par les macrophages, et d'augmenter l'accessibilité aux autres cellules hépatiques. Cette étude a également permis de mettre en évidence une différence de la distribution des siRNA entre le foie sain et le foie fibrotique, et de sélectionner la formulation DMAPAP/DOPE/Chol qui permet une administration des siRNA aux cellules stellaires hépatiques dans le modèle CDAHFD. Parallèlement à l'étude de l'efficacité des différentes formulations de lipoplexes, un modèle d'étude *in vitro* a été développé afin d'évaluer l'efficacité d'extinction des différentes séquences de siRNA anti col1 α 1 et a permis de sélectionner 3 séquences de siRNA qui ont présenté une importante efficacité d'inhibition *in vitro* afin d'être injectées aux souris CDAHFD. Un modèle d'activation des HSCs *in vitro* a également été développé. Cependant, par manque de temps, les siRNA n'ont pas pu être testés sur ce modèle. La formulation DMAPAP/DOPE/Chol a été utilisée afin de vectoriser un mélange des trois séquences validées de siCol pour une administration IV aux souris CDAHFD. Cette expérimentation a dû être interrompue, en raison du confinement lié à la COVID-19. Les résultats devront être exploités prochainement et l'expérimentation sera reproduite afin de réaliser le plan complet d'injections.

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

Dans cette étude, nous avons mis en évidence, dans un premier temps, la présence d'une hypertrophie de cellules stellaires contenant une accumulation de gouttelettes de rétinoïdes fluorescentes dans un foie présentant une fibrose hépatique. Ce phénomène a été observé à la fois dans des modèles animaux tels que CDAHFD, MCD, HFHC et CCl₄ mais également sur des biopsies humaines de patients atteints de fibrose hépatique due à différentes étiologies (NASH, alcoolisme et hépatite). Nous avons pu confirmer que le signal de fluorescence observé est spécifique des rétinoïdes, grâce à une analyse spectrale de ces gouttelettes.

L'hypertrophie des HSCs n'a jamais été évoquée dans un contexte de fibrose hépatique. Cependant, une augmentation du diamètre et du nombre et des gouttelettes de rétinoïdes dans les HSCs a déjà été décrite comme étant liée au vieillissement chez la souris (20-22 mois) et le rat (24-27 mois) (Warren et al., 2011). Des cellules stellaires gorgées de rétinoïdes ont également été observées chez les vieux babouins, ne présentant pas de maladies hépatiques (Cogger et al., 2003). Cependant, les souris que nous avons étudiées dans les trois modèles nutritionnels (CDAHFD, MCD et HFHC) étaient âgées de 6 à 8 semaines au début du régime, de même que les souris SD. Une hypertrophie des HSCs a également été observée chez les animaux de l'Arctique (ours polaires et phoques) qui présentent une capacité élevée d'absorption et de stockage de la vitamine A, qui peut atteindre 20 à 100 fois les niveaux normalement trouvés chez l'humain, le rat et la souris (Senoo et al., 2007). Cette hypertrophie des HSCs a également été décrite comme étant associée à des dérégulations alimentaires dues à une hypervitaminose A (Mounajjed et al., 2014; Nollevaux et al., 2006). Or, dans les modèles étudiés (CDAHFD, MCD, HFHC et CCl₄), la quantité de vitamine A dans les différents régimes alimentaires des souris n'est pas plus élevée que celle dans un régime standard. De plus, la quantité globale de rétinoïdes (esters de rétinyle et rétinol), dosée dans le foie des souris CDAHFD, est toujours plus faible que celle dans le foie sain des souris SD. Ces résultats sont cohérents avec ce qui a été décrit dans d'autres modèles animaux. En effet, une diminution des rétinoïdes (rétinaldéhyde, et rétinol) a été observée dans le foie de rats atteints de cirrhose induite par le CCl₄ ou la thioacétamide (Natarajan et al., 2005).

Dans la littérature, plusieurs études ont montré une diminution des taux sériques de rétinol chez des patients atteints de maladies hépatiques chroniques comme les NAFLD, la NASH, l'hépatite C ou encore le carcinome hépatocellulaire (Botella-Carretero et al., 2010; Chaves et al., 2014; Liu et al., 2015; Newsome et al., 2000; Yadav et al., 2002). Cependant, peu d'études ont évalué les concentrations hépatiques des rétinoïdes chez les patients souffrant de maladies hépatiques. En effet, il a été montré, sur des biopsies hépatiques humaines, que les

taux hépatiques de palmitate de rétinyle étaient inversement associés à l'activation des HSCs, mesurée par l'expression du α -SMA. Une faible tendance à la baisse de palmitate de rétinyle tissulaire avec le stade croissant de fibrose a également été constatée chez ces patients (Kataria et al., 2016). Une diminution significative des taux hépatiques de rétinol a également été observée sur des biopsies de patients atteints de NAFLD ou de cirrhose alcoolique (Leo et al., 1993). De plus, Ashla et al. ont montré une augmentation de l'expression hépatique des gènes impliqués dans l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque chez les patients atteints de NAFLD (Ashla et al., 2010). Néanmoins, les modifications possibles du métabolisme de la vitamine A dans les maladies du foie sont encore mal comprises en particulier dans le stockage des esters de rétinyle par rapport aux formes circulantes de rétinol (rétinoïdes) et la redistribution possible des pools de vitamine A dans le foie et / ou aux tissus extra-hépatiques (Saeed et al., 2018). Des études supplémentaires sont indispensables pour clarifier le statut des esters de rétinyle dans le foie humain présentant une fibrose.

L'accumulation des rétinolides que nous avons observée dans les cellules stellaires hypertrophiées pourrait s'expliquer par une redistribution spatiale hétérogène des rétinolides dans le tissu hépatique. Cela peut nous amener à supposer qu'au cours de la fibrogénèse du foie, certaines HSCs perdent leurs gouttelettes de rétinolides et se transforment en myofibroblastes, conduisant à la diminution de la quantité globale de rétinolides hépatiques. Parallèlement, une deuxième population de HSCs conserverait leur capacité à stocker les rétinolides restants dans des zones particulières où les rétinolides seraient « sur-concentrés » dans les cellules hypertrophiées.

Dans la littérature, il a été décrit que les cellules stellaires hépatiques perdent leurs gouttelettes de rétinolides lors de leur activation au cours du processus de fibrogénèse. Bien que ce fait soit bien établi, il n'a pas encore été déterminé, sans équivoque, si cette perte des gouttelettes de rétinolides contribue au développement de la fibrose ou se produit simplement comme une conséquence de la progression de la maladie (Blaner et al., 2009). Ce phénomène d'hypertrophie des HSCs que nous décrivons ici peut donc sembler contradictoire avec le dogme de la perte des rétinolides au cours de la fibrose. Néanmoins, une étude récente a montré que les HSCs activées *in vitro* ou *in vivo* après une lésion hépatique (par ligature des voies biliaires) conservaient leurs gouttelettes et qu'une diminution de leur teneur en rétinolides survenait seulement après le début de la dédifférenciation cellulaire (Jophlin et al., 2018). Une autre étude a également souligné que les HSCs activées *in vivo*, dans les modèles murins de fibrose : BDL et CCl₄, ne perdent pas complètement leurs gouttelettes de rétinolides (Iwaisako et al., 2014). De plus, il a été décrit que l'absence de gouttelettes de rétinolides dans les HSCs (chez des souris déficientes en LRAT) ne provoque pas de fibrose spontanée et ne favorise

pas la fibrose induite par la ligature de la voie biliaire ou par l'administration de CCl_4 (Kluwe et al., 2011). Ainsi, bien que la perte des gouttelettes de rétinoides des HSCs soit une caractéristique largement reconnue du développement de la fibrose hépatique, il reste à établir au niveau moléculaire la manière et les raisons pour lesquelles ces gouttelettes disparaissent des HSCs.

Suite à l'observation de HSCs hypertrophiées dans le modèle CDAHFD, qui présente une exacerbation de cette accumulation de rétinoides, très reproductible, puisqu'elle a été retrouvée chez toutes les souris CDAHFD, nous avons recherché, dans la littérature, l'existence de ce phénomène dans d'autres modèles animaux de fibrose. Nous avons constaté la présence de cellules hypertrophiées similaires sur les images microscopiques des coupes hépatiques du modèle CDAHFD (Figure 8, (Matsumoto et al., 2013)), MCD (Figure 3, (Itagaki et al., 2013)), CDAA (*Choline-deficient amino-acid*, Figure 2, (Yang et al., 2014b)) et CCl_4 (Figure 9, (Hellemans et al., 2003)) mais aussi dans un modèle mixte toxique et nutritionnel (injection de streptozotocine associée à un régime riche en graisses (Yamamoto et al., 2016)). Cependant, ces cellules hypertrophiées que nous avons observées n'ont pas été décrites en tant que telles par les différents auteurs (Figure 118).

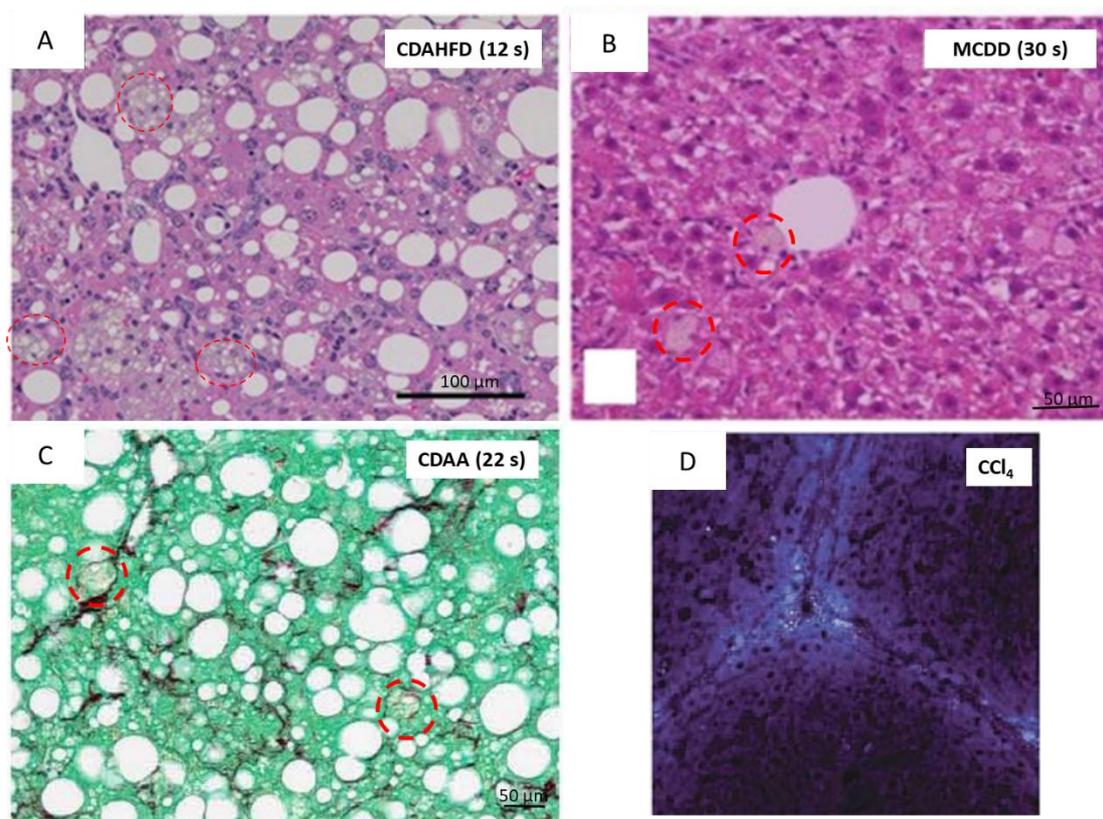


Figure 118 : Présence de HSCs hypertrophiées dans différents modèles de fibrose chez la souris. Images issues de la littérature : A (Matsumoto et al., 2013)), B (Itagaki et al., 2013), C (Yang et al., 2014b)) et D (Hellemans et al., 2003).

Nous avons également mis en évidence la présence de cellules stellaires hypertrophiées dans les modèles MCD et HFHC, mis en place au laboratoire mais également sur le modèle hépatotoxique CCl₄, confirmant que cette hypertrophie n'est pas une caractéristique du modèle CDAHFD. Au contraire, aucune accumulation de rétinoïdes fluorescents n'a été observée sur les coupes hépatiques du modèle cholestatique de lésion hépatique (BDL). Une première hypothèse qui peut expliquer l'absence de cellules stellaires hypertrophiées, dans ce modèle, est que le mécanisme de fibrogénèse est différent de celui des modèles nutritionnels et CCl₄. En effet, dans le modèle BDL, l'obstruction du flux biliaire induit une augmentation de la pression biliaire, une inflammation modérée et une sécrétion de cytokines par les cellules épithéliales biliaires. L'accumulation d'acides biliaires libres peut entraîner l'activation des cholangiocytes et des fibroblastes portaux et déclencher une fibrose biliaire (Dranoff and Wells, 2010; Iwaisako et al., 2014). Ainsi, les HSCs ne sont pas aussi impliquées dans la fibrogénèse induite par BDL que dans la fibrose induite par les régimes alimentaires ou par le CCl₄. En effet, plus de 70% des myofibroblastes, impliqués dans les lésions précoces de la fibrose induite par BDL, proviendraient des fibroblastes péri-portaux tandis que 18% seulement proviendraient de l'activation des HSCs. Au contraire, dans les autres modèles, les HSCs représentent la principale source de myofibroblastes fibrogéniques dans le foie, notamment dans le modèle CCl₄ où 87% des myofibroblastes proviennent des HSCs (Iwaisako et al., 2014). Une deuxième hypothèse est que l'hypertrophie des HSCs apparaîtrait plus tardivement dans le modèle BDL. En effet, les coupes hépatiques que nous avons observées ont été réalisées 10 jours après la ligature de la voie biliaire, or il a été décrit que les HSCs interviennent plus tardivement dans les lésions hépatiques induites par BDL. En effet, 20 jours après la ligature de la voie biliaire, les HSCs activées représentent environ 50% de la population de myofibroblastes (Iwaisako et al., 2014). Une analyse à des temps plus longs serait nécessaire pour visualiser éventuellement une hypertrophie des HSCs dans ce modèle.

Dans un second temps nous avons démontré que l'hypertrophie des HSCs est étroitement liée à la fibrose dans le modèle CDAHFD. En effet, les accumulations des rétinoïdes et les fibres de collagènes présentent la même cinétique d'apparition, de progression ainsi que la même localisation et distribution dans le tissu hépatique. Ce résultat a été rendu possible par la combinaison de l'analyse par microscopie de génération de seconde harmonique (SHG) et par microscopie de fluorescence. Grâce à ces techniques de microscopie que nous avons mises en place spécialement pour les coupes hépatiques CDAHFD, nous avons pu mettre en évidence une association entre l'hypertrophie des HSCs et la fibrose hépatique également sur les modèles MCD, HFHC et CCl₄. De plus, nous avons démontré une corrélation significative entre le stade de fibrose et celui de l'hypertrophie des HSCs ainsi qu'une colocalisation des deux phénomènes sur les biopsies de patients obèses atteints de fibrose hépatique. Une

hypertrophie des HSCs a également été observée sur les coupes de foie de patients présentant une fibrose hépatique due à différentes d'étiologies (NASH, VHC ou alcoolisme). Ces résultats renforcent notre hypothèse selon laquelle l'hypertrophie des HSCs est liée à la fibrose hépatique induite par les HSCs.

Ces résultats pointent également l'intérêt de la microscopie multi-photonique pour le suivi de la fibrose hépatique et la détection de l'hypertrophie. Contrairement aux colorations histologiques qui peuvent entraîner des erreurs de lecture en raison d'un marquage hétérogène du collagène, la SHG, ne nécessitant aucun traitement de la coupe hépatique, est beaucoup plus sensible pour détecter la présence du collagène fibrillaire dans le foie. En effet, cette technique de microscopie non linéaire permet d'obtenir un signal très spécifique du collagène avec un rapport signal/bruit élevé, quelle que soit la méthode de préparation de l'échantillon (tissu non fixé, inclu en paraffine, congelé). La SHG apparait comme un outil original et puissant pour l'évaluation de la fibrose hépatique à la fois dans les modèles animaux mais également chez l'humain. Au cours des deux dernières décennies, plusieurs méthodes de quantification du signal de collagène par SHG, en corrélation avec les scores histologiques ont été développées, permettant de déterminer le stade de fibrose sur les coupes hépatiques humaines ou dans des modèles animaux (Strupler et al., 2007; Sun et al., 2008; Tai et al., 2009). Ainsi, sur des biopsies de patients atteints de fibrose, la fiabilité et la sensibilité élevée de la SHG a permis de distinguer plusieurs niveaux de fibrose au sein d'un même stade Metavir (Gailhouse et al., 2010). L'utilisation de la SHG en clinique serait d'un grand intérêt pour une évaluation standardisée de la fibrose sur les biopsies hépatiques, sans coloration ni examen pathologique. De plus, sa combinaison à la microscopie de fluorescence permettrait de détecter la présence de l'hypertrophie des HSCs grâce à l'auto-fluorescence des rétinoides. Cependant, un équipement sophistiqué est indispensable pour la réalisation de cette analyse.

Bien qu'une corrélation entre la fibrose hépatique et l'hypertrophie des HSCs a été mise en évidence, le rôle de ces cellules stellaires hypertrophiées dans la fibrose reste à déterminer, que ce soit sur les modèles animaux ou chez l'humain. L'éventuelle implication de ces cellules hypertrophiées dans la production des fibres de collagène dans le foie fibrotique est également à élucider. Une analyse transcriptomique des HSCs hypertrophiées isolées à partir de foie de souris CDAHFD pourrait être d'un grand intérêt pour répondre à cette question.

Les résultats préliminaires que nous avons obtenus chez l'humain sont très encourageants. Cependant, l'analyse a été réalisé sur près de 45 biopsies hépatiques humaines présentant une fibrose hépatique de différentes étiologies, un nombre plus important d'échantillons est nécessaire pour confirmer avec certitude la corrélation entre l'hypertrophie des HSCs et la fibrose hépatique chez l'humain. Une étude plus poussée permettrait également de déterminer

si cette hypertrophie des HSCs observée chez l'humain est un évènement transitoire qui apparaît essentiellement dans les premiers stades de la maladie et qui devient plus rare avec la progression de la maladie ou, au contraire, si c'est un évènement qui évolue de manière concomitante avec la fibrose. Répondre à ces interrogations, pourrait être d'un grand intérêt pour l'utilisation de l'hypertrophie des HSCs comme un éventuel marqueur précoce de fibrose en clinique.

La caractérisation par immunohistochimie des cellules présentes dans les zones d'hypertrophie à l'aide des marqueurs spécifiques des cellules stellaires, a suggéré que plusieurs populations de HSCs coexistent dans ces zones. En effet, nous avons identifié que certaines cellules localisées dans les zones d'hypertrophie présentent, en plus des accumulations de gouttelettes de rétinoides, l'expression i) de la desmine, un marqueur spécifique des HSCs quel que soit leur état d'activation, ii) du cRBP1, un marqueur lié aux rétinoides et iii) du α -SMA, un marqueur de HSCs activées. Ces résultats nous amènent à proposer que ces cellules présentent un phénotype distinct de celui des cellules quiescentes, en raison de l'expression du α -SMA, et de celui des cellules activées, compte tenu de l'expression du cRBP1 et de l'accumulation des gouttelettes des rétinoides. En effet, il a été décrit dans la littérature, que les HSCs sont des cellules polyvalentes dans leur capacité à acquérir différents phénotypes lors des lésions hépatiques : cellules quiescentes, activées, dédifférenciées en myofibroblastes. Récemment, un nouveau phénotype de cellules stellaires « inactivées » a été décrit, associé la réversion de la fibrose hépatique. Ces HSCs inactivées présentent une expression génique différente des cellules quiescentes ou activées. Ainsi, elles sont caractérisées par une diminution de l'expression des gènes fibrogéniques (tels que α -SMA et Col1 α 1) et une réexpression de certains gènes associés à la quiescence des HSCs comme PPAR- γ . Cependant, elles sont plus sensibles aux stimuli pro-fibrogéniques que les HSCs quiescentes, et contribuent plus efficacement à la fibrose hépatique (Kisseleva et al., 2012; Liu et al., 2013; Troeger et al., 2012). De même, deux populations de HSCs seraient présentes naturellement dans un foie sain, avec un profil d'expression protéique distinct ainsi qu'une hétérogénéité dans leur capacité de stockage de l'ester de rétinyle dans les gouttelettes lipidiques (D'Ambrosio et al. 2011). Cette étude considère que dans un foie sain, une population de HSCs exprimant le collagène de type 1, et possédant un taux faible d'ester de rétinyle serait des cellules « pré-activées ». Ces cellules pourraient ainsi servir de « primers » pour l'activation des HSCs et seraient les premières cellules intervenant lors d'une réponse à une atteinte hépatique (D'Ambrosio et al. 2011).

Une hypothèse que nous avons émise pour expliquer ce phénotype particulier de HSCs hypertrophiées est que lors de l'apparition de la fibrose hépatique, une réorganisation du tissu

se produit, accompagnée d'un stockage hétérogène des rétinoïdes, donnant lieu à un phénotype particulier de HSCs hypertrophiées. Des travaux supplémentaires sur les échantillons hépatiques humains sont nécessaires afin de déterminer si ce phénotype de HSCs observé chez la souris est retrouvé chez l'humain. Les protocoles d'immunohistochimie doivent être adaptés pour les coupes humaines, et un nombre plus important d'échantillons humains est indispensable.

Il reste à déterminer si ce phénotype apparaît avant l'activation complète des HSCs donnant naissance à des cellules « pré-activées » présentant un phénotype intermédiaire, ou s'il s'agit d'une étape d'activation de HSCs avant leur différenciation en myofibroblastes. Une autre possibilité est que l'apparition de ce phénomène survient parallèlement à l'activation des HSCs, suivant une voie totalement différente.

Le prochain défi sera de déchiffrer les mécanismes et les signaux sous-jacents qui conduisent à l'hypertrophie des HSCs. Nous émettons l'hypothèse que l'apparition des HSCs hypertrophiées est probablement due à des signaux assez complexes qui pourraient impliquer plusieurs types de cellules hépatiques ainsi que la matrice extracellulaire environnante. C'est pourquoi des études basées sur des cultures organoïdes reproduisant le microenvironnement hépatique lésé seront potentiellement nécessaires pour identifier ces mécanismes et signaux.

Un autre défi sera d'évaluer les conséquences de l'hypertrophie sur les fonctions connues des HSCs notamment par une analyse transcriptomique. Cela nécessitera d'isoler les HSCs hypertrophiées, en adaptant les protocoles qui ont été conçus pour les HSCs non hypertrophiées et les foies non stéatosiques. Le principe de séparation des HSCs étant basé sur leur plus faible densité par rapport aux autres cellules hépatiques, la présence d'hépatocytes chargés de lipides dans le foie stéatosique peut interférer avec la pureté de la préparation. De plus, la forte accumulation de fibres de collagène pourrait perturber la dissociation enzymatique du foie fibrotique. Le protocole d'isolement de HSCs hypertrophiées à partir du foie de souris CDAHFD est en cours de développement dans notre laboratoire.

En conclusion, l'existence d'un phénotype particulier de HSCs hypertrophiées étroitement lié à la fibrose hépatique est d'un grand intérêt pour l'étude du rôle des HSCs dans le processus de fibrogénèse. Cet intérêt vient également du fait que ce phénotype apparaît dans un contexte *in vivo* accompagné par l'inflammation et la stéatose. Une caractérisation plus poussée de ces HSCs hypertrophiées éclairerait les mécanismes d'activation des HSCs mais permettrait également l'identification de gènes potentiellement impliqués dans la fibrogénèse qui constitueraient de nouvelles cibles pour une stratégie thérapeutique basée sur l'ARN

interférence. Ainsi, par administration de siRNA spécifiques, l'extinction de ces gènes pourrait induire un effet anti-fibrotique.

La deuxième partie de ma thèse avait pour but d'inhiber l'expression du collagène de type 1 dans le modèle CDAHFD, en utilisant des vecteurs de siRNA spécifiques. L'utilisation de l'ARN interférence présente un grand potentiel dans les thérapies visant à éteindre l'expression d'une protéine donnée, *via* une dégradation sélective de l'ARNm difficilement accessible par les médicaments conventionnels. En effet, plusieurs équipes de recherche ont utilisé les siRNA pour l'inhibition de l'expression du collagène dans des modèles de fibrose (Calvente et al., 2015; Kaps et al., 2015; Molokanova et al., 2018; Toriyabe et al., 2017). Cependant, toutes ces études ont été réalisées sur le modèle CCl₄ ou BDL qui présentent des caractéristiques pathologiques différentes de la physiopathologie humaine de la NASH et sont donc peu représentatifs de la fibrose hépatique métabolique. Le modèle CDAHFD que nous avons utilisé pour le développement des vecteurs de siRNA anti-collagène est un modèle intéressant pour sa reproductibilité ainsi que sa rapidité à induire une fibrose marquée qui est, de plus, accompagnée d'une stéatose et d'une inflammation et donc proche de la physiopathologie de la NASH. A ce jour, aucune étude utilisant des siRNA n'a été réalisée sur le modèle CDAHFD.

En raison des caractéristiques intrinsèques des siRNA (nature polyanionique, taille) ainsi que leur faible stabilité dans les milieux biologiques, des systèmes de vectorisation sont nécessaires pour faciliter leur administration *in vivo*. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser les lipoplexes, composés de lipide cationique et d'acide nucléique. Un plasmide, ne contenant pas de cassette d'expression a été ajouté en tant qu'adjuvant anionique. En effet, notre équipe a montré que l'ajout d'un ADN plasmidique aux lipoplexes permet d'améliorer la condensation des siRNA et d'augmenter ainsi leur efficacité de transfection (Rhinn et al., 2009). L'ADN plasmidique pourrait également être remplacé par un polymère anionique non toxique et biodégradable comme l'alginate ou le polyglutamate pour une éventuelle utilisation des vecteurs de siRNA en clinique (Schlegel et al., 2011).

Des études précédentes réalisées dans notre laboratoire ont montré l'efficacité du liposome DMAPAP/DOPE pour l'administration des siRNA *in vivo* notamment dans un modèle d'arthrite rhumatoïde (Khoury et al., 2006, 2008), d'ostéosarcome (Rousseau et al., 2011) ou d'hépatite B (Marimani et al., 2015). Les lipoplexes préparés à partir de ce liposome présentent une internalisation importante par les cellules du système réticulo-endothélial mais également par les hépatocytes, entraînant une élimination rapide des lipoplexes de la circulation sanguine (Schlegel et al., 2013a). Cette formulation était bien adaptée pour les trois modèles décrits ci-dessus, puisqu'il s'agissait de cibler des macrophages, des ostéoclastes, qui possèdent une capacité de phagocytose élevée ou encore des hépatocytes. Or, pour la fibrose, ce sont les

cellules stellaires qui sont notre cible cellulaire majeure, mais comparées aux hépatocytes, ces cellules sont peu nombreuses dans le foie. Compte tenu de la perte des fenestrations de l'endothélium des sinusoides observée lors de la fibrose hépatique et de la présence d'une MEC environnante très dense dans un foie fibrotique, atteindre les HSCs avec des lipoplexes de siRNA, présentant une taille de 100 à 200 nm, peut s'avérer très difficile. Par conséquent, il est fondamental de démontrer une internalisation des siRNA dans les HSCs avant d'étudier l'efficacité thérapeutique des vecteurs. Le choix de la formulation utilisée est donc très important.

Pour augmenter le temps de circulation des lipoplexes *in vivo* et diminuer leur absorption par le système réticulo-endothélial, nous avons donc choisi d'ajouter du cholestérol ou des lipides PEGylés (échangeables ou non-échangeables) dans les liposomes utilisés pour la formation des lipoplexes. Ainsi, sept formulations différentes ont été développées et leur efficacité a été évaluée *in vitro* et *in vivo*.

Afin d'étudier l'efficacité des différentes formulations pour l'administration des siRNA *in vivo*, nous avons choisi deux techniques : la cytométrie en flux et la microscopie de fluorescence sur des coupes réalisées au vibratome. Ces deux techniques sont différentes mais complémentaires. En effet, la microscopie de fluorescence permet de visualiser la distribution des siRNA dans le tissu hépatique et de déterminer si la localisation des siRNA est homogène et uniforme ou s'ils sont concentrés dans une seule zone notamment autour des vaisseaux. Elle permet également, si on utilise un bon marqueur membranaire, de déterminer si le signal du siRNA est à l'intérieur de la cellule ou s'il est seulement associé à la membrane. La cytométrie en flux, quant à elle, ne permet pas de visualiser la localisation des siRNA ni dans le tissu ni à l'intérieur de la cellule. En effet, elle quantifie le signal au niveau de la cellule entière, ainsi, un événement positif est obtenu même si les siRNA ne sont pas internalisés par la cellule et sont seulement associés à la membrane cellulaire. En revanche, la cytométrie permet d'analyser un nombre plus important d'échantillons allant jusqu'à des centaines de milliers de cellules, avec la possibilité de les trier en fonction de leurs propriétés ce qui est impossible avec la microscopie de fluorescence.

Nous avons choisi de réaliser des coupes hépatiques au vibratome pour l'analyse par microscopie de fluorescence. Cette technique présente un grand intérêt pour la visualisation de cellules entières, permettant de mieux évaluer l'internalisation des siRNA par les différents types de cellules hépatiques, de manière qualitative, mais également semi-quantitative.

Dans un premier temps l'analyse de la distribution des siRNA en utilisant les différentes formulations a été réalisée dans le foie de souris saines. Cette étude a montré que malgré la légère diminution de leur efficacité de transfection *in vitro*, les lipoplexes contenant des lipides

PEGylés échangeables présentent la plus importante efficacité d'administration des siRNA aux cellules hépatiques. De plus, nous avons montré qu'en ajoutant du cholestérol, un lipide PEGylé échangeable, ou les deux simultanément, l'internalisation des siRNA par les cellules de Kupffer est diminuée tandis que celle par les autres cellules hépatiques (hépatocytes, HSCs) augmente. En effet, il a déjà été démontré que l'ajout de lipides PEGylés permet d'augmenter la stabilité des lipoplexes *in vivo* ainsi que leur temps de circulation. De plus, si le lipide PEGylé est échangeable, la libération endosomale du siRNA est améliorée (Shi et al., 2002; Thèse de Anne Schlegel, 2012).

Ces résultats permettent également de mettre en évidence que la nature des lipides formant les lipoplexes permet d'orienter les vecteurs de siRNA vers un type cellulaire en particulier (hépatocytes, HSCs, Kupffer ou cellules endothéliales), même en absence de ligand cellulaire spécifique. Un ciblage spécifique n'est donc pas forcément indispensable pour atteindre les cellules cibles. Cependant, ces résultats ont été observés chez des souris saines, l'analyse par cytométrie en flux de la répartition des siRNA dans les différents types de cellules hépatique doit être reproduite sur un foie fibrotique de souris CDAHFD, car l'architecture hépatique est très différente.

Dans un second temps, l'efficacité d'administration des différentes formulations a été évaluée par microscopie de fluorescence, sur des souris CDAHFD. Les résultats obtenus étaient différents de ceux observés chez les souris saines. En effet, c'est la formulation DMAPAP/DOPE/Chol qui a présenté la plus importante biodisponibilité de siRNA dans le foie fibrotique comparée à toutes les autres formulations. Il a été décrit que l'ajout du cholestérol dans la formation des lipoplexes améliore la stabilité sérique ainsi que l'efficacité de transfection en favorisant la fusion membranaire et donc le relargage endosomal (Hosseini et al., 2019; Pozzi et al., 2012). Cette différence d'observation entre les souris saines et les souris CDAHFD est probablement due à l'architecture complètement déstructurée du foie fibrotique. En effet, la présence des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes ainsi que l'accumulation des fibres de collagène dans le foie présentant une fibrose peut modifier l'accessibilité aux cellules ainsi que la distribution des différentes formulations.

L'analyse par microscopie de fluorescence de la répartition des siRNA, dans les différents types de cellules hépatique des souris CDAHFD, a montré une internalisation importante des lipoplexes par les cellules de Kupffer, quelle que soit la formulation testée, probablement, en raison de leur forte capacité à phagocyter les particules exogènes. Dans le but de cibler les HSCs dans le foie fibrotique des souris CDAHFD, nous avons évalué l'internalisation des siRNA par les cellules stellaires *in vivo* selon les formulations testées. Certaines cellules stellaires ont présenté une colocalisation avec le signal fluorescent des siRNA, en utilisant les

formulations DMAPAP/DOPE, DMAPAP/DOPE/Chol ou DMAPAP/DOPE/CerPEG. Cependant, la desmine étant un marqueur des filaments intermédiaires, et non un marqueur membranaire, il est difficile de déterminer avec certitude si le signal du siRNA observé est bien à l'intérieur de la cellule, en particulier en raison de la proximité des HSCs et des cellules de Kupffer dans un foie fibrotique. Une des solutions pour confirmer cette internalisation des siRNA serait d'utiliser un marqueur membranaire de HSCs, comme la synaptophysine ou encore d'isoler les HSCs à partir de foie de souris injectées avec les lipoplexes contenant les siRNA fluorescents et de réaliser ensuite un immuno-marquage de la desmine afin de quantifier par cytométrie en flux, la présence du signal de siRNA et de celui de la desmine.

Les résultats de la distribution des siRNA dans un foie fibrotique restent préliminaires puisque pour chaque formulation de siRNA, une seule souris a été étudiée, une analyse d'un nombre plus important de souris injectées avec la même formulation est nécessaire.

La troisième partie de ma thèse avait pour but de comparer l'efficacité d'inhibition *in vitro* des différentes séquences de siRNA anti collagène 1 afin d'en choisir une ou plusieurs à injecter aux souris CDAHFD.

La validation de l'efficacité d'une séquence de siRNA pour inhiber l'expression d'une protéine donnée n'est pas toujours facile, en particulier si l'objectif est de démontrer une diminution de l'expression au niveau protéique, et pas seulement au niveau de l'ARN messager. Le modèle cellulaire, que nous avons développé, peut être d'un grand intérêt pour l'évaluation, la comparaison et la quantification de l'efficacité d'inhibition des siRNA. En effet, il peut être appliqué à n'importe quelle cible moléculaire, sans nécessité d'obtenir un anticorps spécifique de la protéine étudiée. Comme l'ADN plasmidique est utilisé en tant qu'adjuvant anionique pour la formation des lipoplexes, il convient de cloner le gène codant la protéine d'intérêt dans la construction plasmidique et d'utiliser un anticorps anti-myc indépendamment de l'anticorps de la protéine d'intérêt. Pour valider l'efficacité des siRNA anti-Col1 α 1, nous avons utilisé les cellules B16 car elles présentent une facilité de transfection et sont les cellules classiquement utilisées dans notre laboratoire, les conditions optimales pour leur transfection sont bien connues. Néanmoins, le modèle cellulaire développé peut être appliqué à n'importe quel type cellulaire, y compris les HSCs primaires ou encore des lignées de HSCs comme la lignée humaine LX-2. Puisqu'il s'agit d'une lignée humaine, il serait intéressant d'évaluer l'efficacité d'inhibition de l'expression d'une protéine donnée, codée par la construction plasmidique, sur ces cellules, en utilisant des siRNA spécifiques de souris, puisque l'expression de la protéine endogène ne sera pas affectée par les siRNA introduits dans les cellules. Cette lignée serait également d'un grand intérêt pour évaluer l'efficacité des lipoplexes développés pour

l'administration des siRNA aux cellules stellaires et valider ainsi la formulation sur des cellules humaines.

Grâce au modèle cellulaire développé, nous avons pu sélectionner trois séquences de siRNA anti-Col1 α 1, les plus efficaces *in vitro*, dans le but d'obtenir un effet thérapeutique synergique des vecteurs de siRNA dans le modèle CDAHFD. De plus, comme le DMAPAP/DOPE/Chol a présenté la plus importante efficacité d'administration des siRNA au foie fibrotique de souris CDAHFD, et une colocalisation du signal de siRNA avec les HSCs, cette formulation a été choisie pour l'administration des siRNA anti-Col1 α 1 aux souris CDAHFD.

Pour conclure, au cours de cette étude, nous avons développé des formulations-candidates qui pourraient être intéressantes pour l'administration des siRNA aux cellules stellaires hépatiques dans un foie fibrotique. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces résultats. La stratégie d'ARN interférence offre la possibilité d'inhiber simultanément l'expression de deux ou plusieurs cibles moléculaires différentes. En effet, lorsque la formulation, qui permet une administration préférentielle des siRNA aux cellules cibles, est développée, il est possible de l'utiliser afin d'administrer plusieurs siRNA au sein de la même particule. Cette stratégie multi-cibles peut également être appliquée à différentes cibles cellulaires. Ainsi, des lipoplexes qui sont internalisés par plusieurs types de cellules hépatiques peuvent être utilisés pour administrer différentes séquences de siRNA visant à inhiber l'expression de différentes protéines impliquées dans la fibrose et exprimées par ces différents types cellulaires. Par conséquent, un ciblage cellulaire spécifique n'est pas forcément nécessaire. Il est possible d'avoir un ciblage par la séquence du siRNA, si la protéine d'intérêt est exprimée exclusivement ou surexprimée par un type cellulaire. Par exemple, notre cible moléculaire est l'ARNm du gène Col1A1, ce gène est cent fois plus exprimé par les HSCs que par les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales ou les hépatocytes (Perepelyuk et al., 2013).

Matériels et méthodes

Matériels et Méthodes

1. Animaux et échantillons humains

1.1 Animaux

Des souris mâles C57BL/6 âgées de 6 semaines (Janvier Labs Inc., Rennes, France) ont été hébergées dans des cages (5 par cage) à 23 +/- 3°C selon un cycle de 12h jours / 12h nuit. Après une semaine d'acclimatation, les souris ont été divisées en 2 groupes expérimentaux et soumises soit à un régime standard (SD, Specific Diet Services, England 841201, teneur en vitamine A 8000 UI / kg), soit à un régime riche en lipides, déficient en choline et contenant 0,1% de méthionine (CDAHFD, Safe Diets, France U8958P Version 0247, teneur en vitamine A 5280 UI / kg) pendant 22 semaines. Plusieurs groupes de souris ont été sacrifiées après 3, 6, 9, 12 et 15 semaines de régime. L'expérimentation a été reproduite huit fois (N = 8) avec 15 à 30 souris soumises au régime CDAHFD par expérimentation (n = 15-30).

Deux autres groupes de 15 souris chacun ont été soumis soit à un régime déficient en méthionine et en choline (MCD, Safe Diets, MCD AIN 76, teneur en vitamine A 4424 UI / kg) pendant 9 semaines, soit à un régime riche en graisses et en glucides (HFHC, Safe Diets, 260HF, teneur en vitamine A 5207 UI / kg) avec une eau de boisson contenant du fructose (23,1 g / L) et du saccharose (18,9 g / L) pendant 16 semaines. Les souris ont été pesées et leur comportement suivi une à deux fois par semaine. L'utilisation d'animaux pour ce projet a été approuvée par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale (n° d'autorisation APAFIS : #4029) et autorisé par le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

1.2 Échantillons humains

Plusieurs types d'échantillons de foie humain ont été utilisés. Des échantillons de biopsie chirurgicale ont été prélevés à 27 patients obèses, ayant subi une chirurgie bariatrique, et présentant plusieurs stades de fibrose : F0 (n = 4), F1 (n = 5), F2 (n = 9), F3 (n = 5) et F4 (n = 4). Les patients font partie d'un protocole de recherche clinique (FIBROTA, numéro P100503 –IDRCB 2011-A00759-32), qui a été enregistré sur le site Web des essais cliniques (NCT01655017). Des biopsies hépatiques humaines ont été également obtenues et provenant des patients ayant subi une biopsie hépatique à l'aiguille entre 2008 et 2019 pour suspicion de NASH (n = 4), hépatite virale C (n = 7) ou alcoolisme (n = 5). Ces biopsies nous ont été fournies par le service d'Hépatogastroentérologie de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Les échantillons ont été inclus en paraffine, coupés au microtome (coupes de 3 µm d'épaisseur)

et, soit colorés au Sirius Red & Hémalun pour l'évaluation du score de fibrose, soit non colorées pour l'analyse par microscopie de fluorescence. Pour chaque biopsie, le stade de fibrose (F0 à F4) a été évalué selon la classification NASH-CRN (Kleiner et al., 2005), avec la seule modification de regrouper les trois sous-étapes (1a, 1b et 1c) en un seul score F1 pour les échantillons NASH ou de la cohorte, ou selon le score METAVIR pour la fibrose due à l'alcool ou aux hépatites virales. L'étude a été menée conformément à la Déclaration d'Helsinki. Les données humaines et la collecte des échantillons ont été validées par le Comité d'éthique (CPP Ile-de-France 1). Tous les sujets ont signé un consentement éclairé écrit avant la biopsie hépatique ou lorsqu'ils ont été inclus dans l'essai clinique FIBROTA (NCT01655017).

2. Expériences sur souris

2.1 Traitement des échantillons de foie

A chaque temps, les souris sont anesthésiées par un mélange de kétamine/xylazine (100/10 mg / kg) en intrapéritonéal, le sang est collecté par ponction cardiaque et les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale. Le foie est prélevé, pesé et les différents lobes sont séparés et fixés dans une solution de para-formaldéhyde 4% (PFA, Electron Microscopy Sciences, 15714-S) toute la nuit à 4°C pour l'analyse histologique ou congelés dans l'azote liquide pour les analyses biochimiques. Les lobes dédiés aux analyses histologiques sont déshydratés (par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant puis dans des bains de xylène) avant leur inclusion en paraffine. Des coupes de 4 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide du microtome.

Des coupes de foie inclus en paraffine provenant de souris traitées par le CCl₄ ou ayant subi une ligature des voies biliaires (BDL) nous ont été fournies par le Dr. Foufelle. Pour le modèle CCl₄, une solution de CCl₄ (1g/kg de poids corporel dans l'huile d'olive) a été injectée en intrapéritonéal à des souris C57BL/6 âgées de 8 semaines deux fois par semaine pendant 8 semaines. Pour le modèle BDL, le canal biliaire des souris C57BL/6 âgées de 8 semaines a été ligaturé pendant 10 jours comme décrit précédemment (Tag et al., 2015).

2.2 Injection de siRNA fluorescents aux souris

Des souris soumises au régime standard ou CDAHf (pendant 6 à 7 semaines) sont d'abord anesthésiées par un mélange de kétamine/xylazine (100/10 mg/kg) en intrapéritonéal, puis une injection en rétro-orbitale de lipoplexes de siRNA est réalisée, à la dose de 1 mg de siRNA/kg. Les lipoplexes sont préparés comme décrit en 5.2 Préparation des lipoplexes de siRNA. Ces lipoplexes contiennent des siRNA non spécifiques dont l'extrémité 5' d'un des

brins du duplex est couplée soit au fluorophore AlexaFluor647 pour l'analyse de la distribution hépatique des siRNA par microscopie confocale, soit au fluorophore AlexaFluor488 pour l'étude de la distribution des siRNA par cytométrie en flux. Les séquences de ces siRNA (achetés chez Eurogenetec ®) sont décrites dans le Tableau 21 page 290. Le plasmide pXL3296 est utilisé comme adjuvant anionique à la même dose que celle du siRNA (1mg/kg). Les formulations liposomales utilisées pour la préparation des différents lipoplexes sont décrites dans le Tableau 16.

Type d'analyse réalisée	Cytométrie en flux		Microscopie confocale	
	Souris SD	Souris SD	Souris SD	Souris CDAHFD
<i>Liposomes</i>				
<i>DMAPAP / DOPE</i>	4	1	1 (6 semaines)	
<i>DMAPAP / DOPE / Chol</i>	4	1	1 (6 semaines)	
<i>DMAPAP / DOPE / DODAPPEG</i>	3	-	-	
<i>DMAPAP / DOPE / C14 PEG</i>	3	-	1 (11 semaines)	
<i>DMAPAP / DOPE / cer PEG</i>	3	-	1 (7 semaines)	
<i>DMAPAP / DOPE / Chol / cer PEG</i>	2	1	1 (11 semaines)	

Tableau 16 : Nombre de souris injectées par chaque formulation de lipoplexes de siRNA.

Les valeurs entre parenthèses représentent le nombre de semaines de régime pour les souris CDAHFD

L'étude de la distribution hépatique des siRNA est réalisée par deux techniques : la cytométrie en flux ou la microscopie confocale. Pour cela, deux heures après l'injection, les souris subissent soit une fixation *in situ* du foie par perfusion pour l'analyse par microscopie confocale, soit une digestion enzymatique *in situ* du foie pour la cytométrie.

2.3 Fixation *in situ* par perfusion

Deux heures après injection des souris, une perfusion transcardiaque de PFA 4% est réalisée pendant 13 min (débit = 15 ml/min). Après prélèvement du foie, les différents lobes hépatiques sont fixés pendant 2h à 4°C dans une solution de PFA 4% puis rincés au PBS. Des coupes hépatiques (épaisseur = 50 µm) sont ensuite réalisées à l'aide du vibratome et conservées à -80°C après plusieurs bains successifs de saccharose. Des expériences d'immunohistochimie sont ensuite réalisées afin de marquer les différents types de cellules hépatiques et d'analyser la distribution hépatique des siRNA par microscopie confocale (Figure 119).

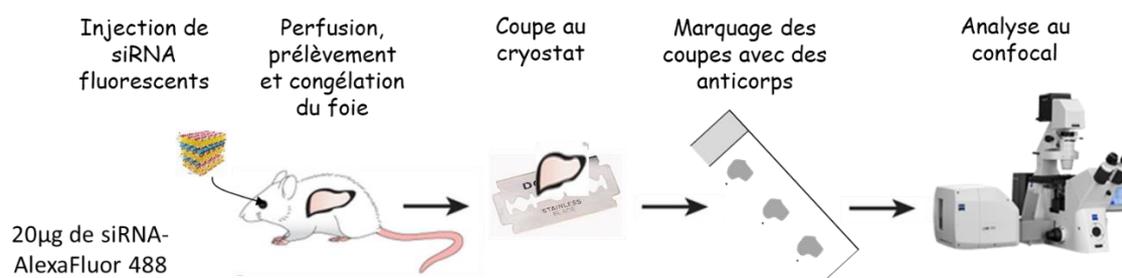


Figure 119 : Etude de la localisation par immunofluorescence sur coupes de foie.

2.4 Dissociation enzymatique *in situ* du foie

La dissociation enzymatique *in situ* du foie est réalisée soit sur des souris SD ou CDAHFD injectées avec des lipoplexes contenant des siRNA fluorescents (voir ci-dessus), soit sur des souris SD non injectées pour l'isolement des HSCs primaires. Pour cela, les souris sont anesthésiées avec une dose létale d'anesthésique (kétamine/xylazine 200/20 mg/kg) en intrapéritonéal. Après laparotomie, le foie est perfusé *in situ* à travers la veine cave supérieure avec un tampon de perfusion préchauffé (37°C) (25 mM HEPES, 1,2 mM KH₂PO₄, 2,3 mM KCl, 86 mM NaCl, 0,5 mM EGTA, pH 7,6). La veine porte est ensuite coupée pour permettre l'évacuation du tampon de perfusion. La perfusion est poursuivie avec 45 ml de tampon de perfusion à un débit de 4 ml/min, contrôlé par une pompe péristaltique. La perfusion hépatique est poursuivie avec 30 ml de tampon de digestion (HEPES 25 mM, KCl 2,3 mM, NaCl 86 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,6) contenant de la collagénase de type I (Gibco 17100-017, 205 U/mg, 1 mg/ml) et de la Dispase (Gibco 17105-041, 1,79U/mg 0,56 mg/ml) (Figure 120).

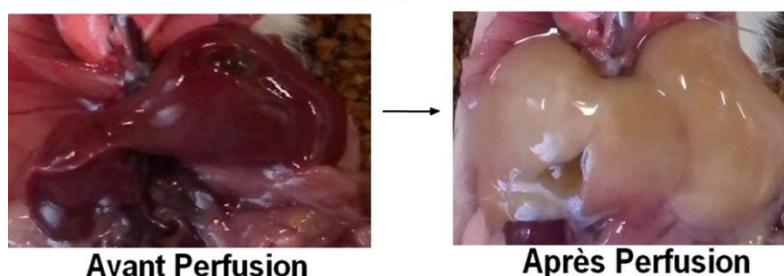


Figure 120 : Images de foie avant et après perfusion.

Le foie est ensuite prélevé, la capsule de Glisson est coupée et les cellules hépatiques sont dispersées dans la boîte de pétri, puis incubées à 37°C pendant 20 min dans les 20 ml restant du tampon de digestion, en agitant régulièrement. La suspension de cellules hépatiques est filtrée (filtre de 70 µm, Biologix 15-1070) sous la hotte à flux laminaire et 5 ml de tampon de digestion ne contenant pas les enzymes est ajouté avant une étape de centrifugation (15 min, 600g, 4°C). Le surnageant est ensuite éliminé et le culot contenant toutes les cellules hépatiques est récupéré.

Lorsque les souris ont été injectées avec un des siRNA fluorescents, une étude de biodistribution par cytométrie en flux est réalisée après immunomarquage des cellules hépatiques (Figure 121).

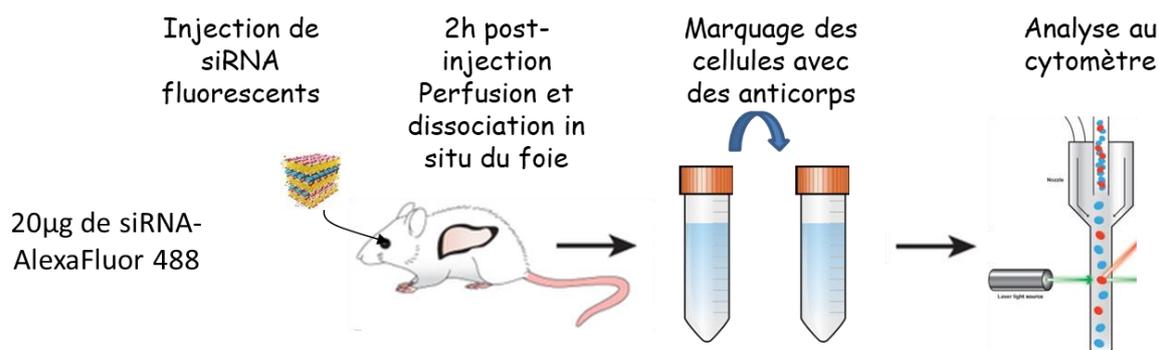


Figure 121 : Etude de la distribution hépatique des siRNA par cytométrie en flux.

2.5 Purification des cellules stellaires primaires de souris

Afin de purifier les HSCs primaires de souris, une dissociation enzymatique *in situ* du foie est réalisée à partir de souris SD. Les tampons utilisés pour la purification des HSCs sont différents de ceux utilisés pour la séparation des cellules hépatiques (Mederacke et al., 2015). Après digestion, le culot de cellules hépatiques récupéré est remis en suspension dans 10 ml d'une solution saline équilibrée de Gey (GBSS, Na₂HPO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 2,7 mM, KH₂PO₄ 0,2 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, MgSO₄ 0,3 mM, glucose 5,5 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 7,4) puis complété jusqu'à 50 ml de GBSS avant une étape de centrifugation (10 min, 200g, 4°C). L'étape de lavage au GBSS est répétée puis une centrifugation (10 min, 580g, 4°C) est effectuée. Le surnageant est aspiré jusqu'à ce qu'il reste 5 ml dans lesquels le culot est remis en suspension, puis du GBSS est ajouté pour un volume final de 32 ml. 16 ml d'une solution de Nycodenz (AbCys, 1002424) (28,6% (p/v) dans du GBSS sans NaCl) stérilisée par filtration (0,20 µm) sont ensuite ajoutés à la suspension cellules-Nycodenz. Le tube est retourné plusieurs fois délicatement pour bien mélanger la suspension et le mélange est séparé en quatre tubes contenant 12 ml chacun de la suspension cellules-Nycodenz, les bords du tube doivent être bien humidifiés. 1,5 ml de GBSS sont ensuite ajoutés sur la surface du mélange cellules-Nycodenz dans chaque tube à l'aide d'une seringue de 3 ml et d'une aiguille 26G, de manière très progressive pour ne pas mélanger les deux solutions et d'obtenir deux phases distinctes. La suspension est ensuite centrifugée (17 min, 4°C, 1380 g, accélération 1, décélération 0). Les HSCs, de plus faible densité que les autres cellules hépatiques, forment une couche fine et blanche à l'interface entre le tampon GBSS et le Nycodenz. Elles sont ensuite récupérées, à l'aide d'une pipette en plastique de 3 ml. La suspension enrichie en HSCs est ensuite lavée avec 50 ml de GBSS et centrifugée (10 min, 580g, 4°C). Le surnageant est aspiré et le culot est remis en suspension dans 1 ml de milieu de culture complet (voir 6.1 Culture cellulaire). Une dilution est réalisée afin de compter les cellules au microscope optique à l'aide d'une cellule de Malassez. Le pourcentage des HSCs est déterminé grâce à l'auto-fluorescence de leurs gouttelettes après une excitation UV.

2.6 Injections des siRNA anti-Col1 α 1 aux souris

Afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique des lipoplexes de siRNA anti-Col1 α 1, 22 souris ont été divisées en 3 groupes : contrôle (n = 8), traité (n = 8), témoin (n = 6) et soumises au régime CDAHf. A partir de la troisième semaine de régime, les souris ont subi des injections hebdomadaires en rétro-orbital de différentes solutions. Pour cela, les souris sont anesthésiées, avec une solution de kétamine/xylazine (100/10 mg/kg) en ip, puis une injection en rétro-orbital est réalisée, avec des lipoplexes contenant soit un siRNA non spécifique (1 mg de siRNA/kg) pour le groupe contrôle, soit un mélange de 3 séquences de siRNA dirigées contre Col1 α 1 (si2Col, si5Col, si6Col) à des quantités équivalentes (0,33 mg de chaque siRNA/kg), pour le groupe traité. Les lipoplexes sont préparés comme décrit en 5.2 Préparation des lipoplexes de siRNA avec le plasmide pXL 3296 (1 mg/kg) en tant qu'adjuvant anionique et le liposome DMAPAP/DOPE/Chol à un R+/- = 8. Les séquences des différents siRNA sont décrites dans le Tableau 21. Les 6 souris du groupe témoin sont injectées avec une solution de NaCl à 150 mM. Des injections hebdomadaires ont été prévues de la 3^{ème} à la 9^{ème} semaine de régime. Cependant, en raison du confinement lié à la COVID-19, les souris ont dû être sacrifiées après la 4^{ème} injection, l'expérimentation a donc été interrompue.

3. Techniques histologiques

3.1 Colorations histologiques

3.1.1 Coloration à l'Hématoxyline et l'Eosine

Une étape de déparaffinage (par immersion dans des bains de xylène puis d'alcool de degré décroissant, de 100 à 70%) est nécessaire avant la réalisation des colorations histologiques. Après rinçage au PBS et à l'eau courante, les lames sont colorées, pendant 90s, à l'Hématoxyline de Gill n°3 (Sigma-Aldrich, GHS332), filtrée préalablement, rincées à l'eau courante avant d'être plongées dans un bain d'une solution de différenciation (Sigma-Aldrich, A3179) pendant 90s puis 2min dans de l'eau lithinée, qui permet un bleuissement du colorant. Après un rinçage à l'eau courante, les lames sont colorées pendant 1 min avec la solution d'Eosine Y (Sigma-Aldrich, HT110232) acidifiée (pH = 4,7) et filtrée préalablement, puis rincées à l'eau courante. Après avoir subi une déshydratation par des bains d'alcool de degré croissant suivi de deux bains de xylène, les coupes colorées sont montées avec une lamelle de verre et un milieu de montage synthétique à durcissement rapide : l'EUKITT (Sigma-Aldrich, 03989). Après séchage sous la hotte, les lames sont prêtes à être observées au microscope optique.

3.1.2 Coloration Sirius Red-Hématoxyline

Après déparaffinage et réhydratation comme décrit ci-dessus, les coupes sont colorées dans un premier temps, par la solution d'Hématoxyline de Weigert (Sigma-Aldrich, HT109) pendant 8 min, rincées à l'eau courante, puis à l'eau distillée. La deuxième coloration est réalisée avec une solution de Sirius Red (Sigma-Aldrich, 365548) dilué à 1g/l dans de l'acide picrique, cette étape dure 1h. Les lames sont ensuite plongées dans 2 bains successifs d'acide acétique à 0,5% permettant leur rinçage, puis déshydratées et montées entre lame et lamelle comme décrit précédemment.

3.2 Immunohistochimie sur coupes hépatiques réalisées au microtome

L'immunohistochimie (IHC) est une technique qui permet la détection, à l'intérieur d'un tissu, d'un antigène donné. L'antigène possède plusieurs épitopes qui sont des sites de liaison aux anticorps. Deux types d'anticorps sont utilisés : un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome dirigé contre l'anticorps primaire. Le démasquage antigénique est une étape indispensable afin de rompre les liaisons moléculaires créées par le fixateur pendant l'inclusion et permettre l'accessibilité des épitopes aux anticorps. Après déparaffinage et réhydratation des lames, celles-ci sont placées dans une solution de tampon citrate (10mM ; pH 6) préalablement préchauffé à 97°C. Les lames sont incubées pendant 30 min à 97°C. Après refroidissement pendant 30 min à température ambiante, les coupes sont entourées d'un trait au crayon hydrophobe DakoPen puis plongées dans un bain de PBS pendant 10 min. Les coupes sont ensuite placées dans un bain de chlorure d'ammonium (NH₄Cl, 50mM) pendant 30 min, afin d'atténuer l'auto-fluorescence endogène, puis rincées au PBS. Avant l'incubation avec l'anticorps primaire, une étape de saturation est nécessaire afin d'éviter le bruit de fond dû à une fixation non spécifique de l'anticorps. Pour cela, les coupes sont saturées, pendant 30 min, par une solution de sérum de l'espèce animale de l'anticorps secondaire (sérum de chèvre, Bio-RAD, C07SAZ) à 20 % (v/v) diluée dans du PBS-BSA 1% (p/v). Les coupes sont ensuite incubées à 4°C toute la nuit avec l'anticorps primaire (Tableau 17) dilué dans du PBS-BSA 1%. En parallèle, des coupes « témoin négatif » ou isotypes sont réalisées en remplaçant l'anticorps primaire par le sérum de l'espèce chez laquelle il a été produit, à la même concentration (IgG de lapin, Life Technologies, 10500C). Les isotypes garantissent la spécificité de la détection.

Cible de l'anticorps primaire	Espèce, référence et dilution
α -SMA	(lapin, abcam, ab124964, 1/1000e)
desmine	(lapin, abcam, ab15200, 1/100e)
c-RBPI	(lapin, abcam, ab15488, 1/500e)
Ki67	(lapin, abcam, ab16667, 1/500e)

Tableau 17 : Anticorps primaires utilisés pour le marquage des coupes au microtome.

Le lendemain, après rinçage dans 3 bains successifs de PBS, les coupes sont incubées, pendant 1h, avec l'anticorps secondaire anti-lapin, produit chez la chèvre et couplé à un AlexaFluor647 (Life Technologies, A21244) dilué au 1/500^e dans du PBS-BSA 1%, rincées au PBS, puis incubées avec le DAPI (0,15 μ g/ml, Sigma-Aldrich, D1388) pendant 5 min, puis lavées au PBS avant un rinçage à l'eau. Pour le montage lame-lamelle, une goutte de milieu de montage (ProLong Gold anti-fade Reagent, Invitrogen, P36934) est déposée et les bords des lamelles sont scellés avec du vernis à ongles transparent. Après séchage, les lames sont conservées à l'obscurité à 4°C pour leur observation au microscope confocal.

3.3 Immunohistochimie sur coupes hépatiques réalisées au vibratome

Avant leur marquage, les coupes réalisées au vibratome sont décongelées à 4°C toute la nuit. Le lendemain, les coupes sont transférées sur une plaque de culture 6 puits, à raison de 2 coupes et 1 ml de saccharose/puits. Les coupes sont en solution et sont manipulées délicatement au pinceau. Trois dilutions successives et progressives de saccharose sont réalisées pour la réhydratation des coupes avec du PBS, en ajoutant 1 ml, 2 ml puis 4 ml de PBS. Les coupes sont ensuite transférées dans une plaque 48 puits à raison d'une coupe/puits et rincées 3 fois dans 1 ml de PBS avant leur incubation pendant 30 min dans du PBS-TritonX100 0,5% (v/v) à température ambiante. Après 3 rinçages de 5 min au PBS, les coupes sont incubées, pendant 1h à température ambiante, avec 300 μ l d'une solution de glycine (100 mM) et NH₄Cl (75 mM) pour atténuer l'auto-fluorescence endogène. Les coupes sont ensuite rincées au PBS et les sites non spécifiques sont saturés, pendant 2h à température ambiante, par une solution de sérum de l'espèce animale de l'anticorps secondaire (sérum de chèvre, Bio-RAD, C07SAZ) dilué à 20 % (v/v) dans du PBS-TritonX100 0,1% (v/v), azoture de sodium 0,02% (p/v) ou par du PBS-BSA 1% pour les coupes marquées avec la phalloïdine-FITC seule. Les coupes sont ensuite incubées, pendant 48h à 4°C, avec l'anticorps primaire (Tableau 18) ou la phalloïdine-FITC (Phalloidin-X5-FluoProbes® 505, Interchim, FP-AZ0130, 1/100^e) dilués dans du PBS-Triton 0,1%, azoture de sodium 0,02%. Un témoin négatif est également réalisé comme décrit précédemment. Après 4 rinçages de 15 min au PBS-Triton 0,1%, les coupes sont incubées pendant 4h à 4°C avec une solution contenant l'anticorps secondaire au 1/500^e

et du DAPI (0,15 µg/ml) dilués dans du PBS-Triton 0,1%, azoture de sodium 0,02%. Trois rinçages au PBS sont ensuite effectués avant le montage des coupes entre lames et lamelles au Glycérol-PBS 90% (v/v). Les lamelles sont ensuite scellées avec du vernis à ongles transparent.

Cible de l'anticorps primaire (espèce, réf, dilution)	Anticorps secondaire	Isotype
Desmine (lapin, abcam, 15200) 1/300 ^e	AlexaFluor488 chèvre anti-lapin (Invitrogen, A11008) 1/500 ^e	IgG de lapin (Life Technologies, 10500C)
F4/80 (CI:A3-1, rat, ThermoFisher, MA5-16632, 1/50 ^e)	AlexaFluor488 chèvre anti-rat (Life Technologies, A11006) 1/500 ^e	IgG de rat (Invitrogen, 10710C)
CD31 (rat, BD Pharmingen, 550274) 1/50 ^e		

Tableau 18 : Anticorps utilisés pour les expériences d'IHC sur les coupes au vibratome.

4. Techniques biochimiques

4.1 Dosages sériques

Le sang des souris collecté à différents temps de régime est réparti dans deux tubes contenant un anticoagulant (EDTA ou héparine), puis centrifugé pendant 5 min à 5.000g et 4°C. Le plasma est ensuite récupéré, son volume mesuré, puis congelé à -80°C. Des dosages de biomarqueurs plasmatiques sont ensuite réalisés avec un multiparamètre Olympus AU 400, au sein de la Plateforme de Biochimie du Centre de Recherche sur l'Inflammation (CRI) CNRS - UMR 1149 Université Paris Diderot.

4.2 Lysats de foies

Après avoir pesé un fragment de foie de souris d'environ 20 mg (conservé à -80°C), on procède à l'extraction des protéines en plaçant l'échantillon dans un tube à billes (billes CK14, 03961-1-0032, Ozyme, France) contenant 400 µl de tampon de lyse RIPA (NaCl 150 mM, Tris HCl 50 mM, pH = 8, désoxycholate de sodium 0,5% (v/v), SDS 0,1% (v/v), TritonX100 1% (v/v), inhibiteurs de protéases (Thermo Scientific™ Pierce) 1% (v/v)), puis en le broyant en utilisant l'homogénéiseur à billes (PRECELLYS®, 7200 RPM, 5 cycles de 30s, pause de 30s après chaque cycle). Les tubes à billes contenant les lysats sont rapidement refroidis et une étape de centrifugation rapide est réalisée afin d'éliminer la mousse formée. Le lysat est ensuite transféré dans un tube de 1,5 ml et centrifugé à 12.000g pendant 20 min, à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est alors récupéré.

4.3 Dosage de la quantité de protéines totales

La concentration en protéines dans les lysats de foie ou de cellules (voir 6.3 Transfection des cellules B16Luc) est déterminée en utilisant le kit BCA Protein Assay (Pierce, 23227) grâce à une gamme réalisée avec l'albumine bovine (BSA) prise comme protéine de référence (gamme étalon préparée dans le même tampon de lyse que l'échantillon : 0 à 1 µg/µl). Pour réaliser le dosage des protéines, une dilution des lysats au 1/100^e et au 1/50^e est réalisée dans le tampon de lyse de l'échantillon et 10 µl de cette dilution sont déposés dans une microplaque de 96 puits, puis incubés avec 200 µl de réactif BCA, pendant 30 min à 37°C. L'absorbance est ensuite lue à 560 nm à l'aide du lecteur de plaques TECAN Pro.

4.4 Western Blot

20 µg de protéines de chaque lysat de foie est ajouté à un tampon de dénaturation (Tris 125 mM, DTT 10 mM, glycérol 5% (v/v), SDS 3% (v/v), bleu de bromo-phénol, BBP 0,01%(v/v)). Afin de dénaturer les protéines, les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 10 min. Pour la migration des protéines, un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) (NuPAGE® 4-12% Bis-Tris, Invitrogen, NP0321BOX) est utilisé. Dans un puits du gel, un marqueur de poids moléculaire (Chameleon™ Duo 928-6000) est déposé. Dans les autres puits, les différents échantillons sont déposés et les protéines sont mises à migrer dans le gel pendant 90 min à 130V, à température ambiante, dans un tampon de migration (NuPAGE® MOPS-SDS, Life Technologies, NP0001). Après migration, un transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est réalisé (1h, 30V) en utilisant le tampon de transfert (NuPAGE®, Life Technologies, NP0006-1). Après rinçage de la membrane, les sites non spécifiques sont bloqués en incubant la membrane, pendant 1h dans un tampon de saturation (Li-Cor Blocking Buffer, 927-70001). Puis la membrane est incubée toute la nuit à 4°C avec les deux anticorps primaires : l'anticorps recombinant anti-α-SMA, produit chez le lapin (abcam, ab124964, 1/4000^e) et l'anticorps polyclonal anti-GAPDH, produit chez la chèvre (R&DSystem, AF5718, 1/4000^e) dilués dans le tampon de saturation Li-Cor contenant du Tween20 à 0,2% (v/v). Le lendemain, après trois lavages dans du PBS-Tween20 0,1% (v/v), la membrane est incubée, pendant 1h à température ambiante, avec les deux anticorps secondaires fluorescents : un anti-lapin produit chez le singe (IRDye®680RD, 925-68073, 1/10.000^e) et un anti-chèvre produit également chez le singe (IRDye®800CW, 925-32214, 1/10.000^e) dilué dans le tampon Li-Cor contenant du Tween20 à 0,2%. Après 4 lavages de 5 min dans du PBS-Tween20 à 0,1%, puis deux bains de PBS, la révélation est effectuée à l'aide d'un imageur par fluorescence (Odyssey Quantitative Fluorescence Imager).

4.5 Dosage de l'activité de la luciférase

Après 48h de transfection des cellules B16Luc, un rinçage au PBS est réalisé avant de lyser les cellules dans 200 µl de tampon de lyse (Luciferase cell culture lysis Reagent, Promega®). Après 15 min, le tapis cellulaire est récupéré puis centrifugé (10 min, 11.000g, 4°C). 10 µl du surnageant sont ensuite déposés dans une plaque 96 puits (blanche). Un dosage de l'activité enzymatique de la luciférase est réalisé en utilisant le kit Luciferase Assay (Promega®). Le lecteur de plaque TECAN Pro permet l'injection de 50 µl/puits de luciférine, qui est oxydée par la luciférase entraînant l'émission de photons. Cette luminescence est détectée immédiatement par le TECAN Pro. L'activité de la luciférase est exprimée en coups par seconde et normalisée, pour chaque échantillon par sa concentration en protéines totales.

4.6 Quantification du dépôt de collagène par les HSCs

Les HSCs primaires de souris sont mises en culture sur un support plastique (plaque 48 puits) à la densité de 25.000 cellules par puits. Le milieu de culture est changé quotidiennement. Après 7 ou 14 jours de mise en culture, le milieu de culture est aspiré et les HSCs sont rincées 3 fois avec 1 ml de PBS, puis fixées pendant 1h avec 1 ml de liquide de Bouin (préparé en mélangeant 15 ml d'acide picrique saturé avec 5 ml de PFA à 35% et 1 ml d'acide acétique glacial). La solution de fixation est ensuite aspirée, le tapis cellulaire est lavé pendant 15 min à l'eau courante et séché pendant 15 min sous la hotte à flux laminaire, puis incubé pendant 1h, sous agitation douce, avec 1 ml de Sirius Red filtré (1g/l, dissout dans de l'acide picrique aqueux saturé) par puits. La solution de Sirius Red est ensuite éliminée et 3 lavages avec une solution de HCl 0,01N sont effectués afin d'éliminer le colorant non lié. Les cellules sont ensuite lysées dans 200 µl de NaOH. Après 30 min sous agitation, le contenu d'un puits est transféré dans le puits adjacent, afin de regrouper les contenus des deux puits, et laissés également sous agitation pendant 30 min. La solution est ensuite transférée sur une microplaque 96 puits et l'absorbance est mesurée à 540 nm en utilisant le lecteur de plaque TECAN Pro. La mesure est réalisée 3 fois pour chaque puits. Un contrôle négatif (blanc) est effectué sur un puits vide ne contenant pas de cellules mais ayant subi toutes les étapes de traitement. La quantification est ensuite réalisée en utilisant une gamme (de 5 à 2.000 µg/ml) préparée avec du collagène (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) dissout dans de l'acide acétique 0,2% à une concentration de 2 mg/ml.

4.7 Extraction et dosage des rétinoides

Les fragments de foie congelés à -80°C sont pesés (40-50 mg) puis placés dans un tube à billes contenant 500 µl de PBS et broyés en utilisant l'homogénéisateur à billes (PRECELLYS®). 100 µl d'éthanol et 200 µl de PBS sont ajoutés à 100 µl de lysat. Afin de contrôler les

rendements d'extraction, 2,5 µg d'étalon interne (acétate de rétinyle, R4632-1G, Sigma) dans l'éthanol sont ajoutés à chaque échantillon. Les échantillons sont homogénéisés par sonication pendant 2 min à température ambiante en utilisant un sonificateur à ultrasons (Duty cycle : 10% ; Output control : 1. Branson 450 Sonifier - Analog Cell Disruptor). Les rétinoïdes présents dans les homogénats sont extraits 5 fois avec 400 µl de cyclohexane, en agitant par vortex pendant 30s, suivi d'une étape de centrifugation pendant 1 min à 1200g. Le cyclohexane est ensuite évaporé pendant 30 min à l'aide d'un speedVac™. L'analyse des rétinoïdes est réalisée par chromatographie en phase inverse sur un système HPLC (Waters Symmetry® 150 x 4,6 mm, colonne C18, 5 µm) à un débit de 1,5 ml / min, en utilisant 70% (v/v) d'acétonitrile, 15% (v/v) de méthanol, 15% (v/v) de dichlorométhane comme phase mobile pendant 10 min, suivie par 89% (v/v) d'acétonitrile, 11% (v/v) d'eau, 0,1% (v/v) d'acide formique pendant 10 min. Le volume d'injection est de 10 µL pour tous les échantillons. Les rétinoïdes sont détectés par absorbance UV à 325 nm et identifiés en comparant leur temps de rétention avec ceux des solutions contrôles. Des solutions standard de rétinol (J62079, Alfa Aesar), d'acétate de rétinyle et de palmitate de rétinyle (J63022, Alfa Aesar) sont préparées dans l'éthanol et utilisées comme courbes d'étalonnage. La quantification a été effectuée comme suit : pour chaque échantillon, le rendement d'extraction a été évalué en utilisant la courbe d'étalonnage de l'acétate de rétinyle. Le rétinol et les esters de rétinyle ont été quantifiés en comparant l'aire sous le pic chromatographique (proportionnelle à la quantité injectée) de chaque rétinoïde avec celles de quantités connues de solutions contrôles de rétinol et de palmitate de rétinyle, respectivement, en utilisant les courbes d'étalonnage. Les quantités sont ensuite corrigées selon le rendement d'extraction déterminé pour obtenir la quantité effective dans chaque échantillon.

5. Techniques physico-chimiques

5.1 Préparation des liposomes

Lipides	Nomenclature	Référence fournisseur
DMAPAP	2-{3-[Bis-(3-amino-propyl)-amino]-propylamino}-N-ditetradecyl carbamoyl methyl-acetamide	Synthétisé au laboratoire (Khoury et al., 2006)
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Avanti Polar Lipids, 850725
Chol	Cholestérol	Avanti Polar Lipids, 700000
DODAPEG	dioctadecylcarbamoylmethoxyacetylaminolacetic acid(methoxy)-polyethylene glycol 2000	Synthétisé au laboratoire (Mignet et al., 2012)
C14 PEG	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]	Avanti Polar Lipids, 880150
Céramide PEG	N-octanoyl-sphingosine-1-{succinyl[methoxy(polyethylene glycol)2000]}	Avanti Polar Lipids, 880170

Tableau 19 : Liste des lipides utilisés pour la préparation des liposomes.

Les liposomes sont préparés par la méthode d'hydratation du film lipidique, décrite par Bangham en 1965. Les lipides utilisés pour la formation des liposomes sont décrits dans le

Tableau 19. Les quantités nécessaires de chaque lipide (Tableau 20) sont pesées dans un ballon en verre de 10 ml et dissoutes dans 1ml de chloroforme. Le solvant est ensuite évaporé progressivement pendant 1h en utilisant un évaporateur rotatif (le RotaVap) jusqu'à la formation d'un film lipidique fin sur la paroi du ballon en verre. Ce film est ensuite réhydraté, pendant 16h à température ambiante, dans 1 ml d'eau distillée filtrée pour obtenir une concentration finale en lipide cationique de 20mM. Les liposomes sont alors extrudés à l'aide du Mini-Extrudeur (Avanti Polar lipids, Inc). Cette technique permet d'obtenir des liposomes monocouches (vésicules unilamellaires) d'environ 100 nm et consiste à forcer une suspension de liposomes à traverser 20 fois une membrane de polycarbonate (Whatman filters, 800282) de porosité 0,4 μm . Les liposomes sont ensuite conservés à 4°C.

Liposomes	Rapport molaire	Quantités en mg pour 1 ml de chloroforme
DMAPAP / DOPE	(1 : 1)	17 / 15
DMAPAP / Chol	(1 : 1)	17 / 7,73
DMAPAP / DOPE / Chol	(1 : 0,5 : 0,5)	17 / 7,5 / 3,87
DMAPAP / DOPE / DODAPEG	(1 : 1 : 0,06)	17 / 15 / 3,3
DMAPAP / DOPE / C14 PEG	(1 : 1 : 0,06)	17 / 15 / 3,23
DMAPAP / DOPE / cer PEG	(1 : 1 : 0,06)	17 / 15 / 3,02
DMAPAP / DOPE / Chol / cer PEG	(1 : 0,5 : 0,5 : 0,06)	17 / 7,5 / 3,87 / 3,02

Tableau 20 : Quantités de lipides nécessaires pour la préparation des différentes formulations liposomales.

5.2 Préparation des lipoplexes de siRNA

Des lipoplexes sont préparés à partir d'un mélange de siRNA et de plasmide (utilisés à la même concentration, 1,33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (100 μM)) et d'un liposome cationique (20 mM) à un rapport de charges R +/- = nmol de charges positives du liposome cationique / nmol de charges négatives du mélange siRNA et plasmide. Sachant que 1 μg de plasmide ou de siRNA apporte 3,08 nmol de charges négatives, la quantité de lipide cationique à ajouter est calculée en fonction de la quantité de siRNA utilisée (1 nmol de DMAPAP = 3 nmol de charges +). Selon les expériences, les lipoplexes sont préparés à R +/- = 2, 4, 6, 8, ou 10. Le siRNA et le plasmide sont dilués dans une solution de NaCl 150 mM. Le liposome est dilué dans le même volume d'une solution de NaCl 150 mM et est ensuite mélangé volume à volume à la solution de siRNA et plasmide. Après agitation par vortex pendant 1 min minimum, le mélange est laissé pendant au moins 30 min à température ambiante.

Tous les siRNA utilisés sont synthétisés par Eurogenetec ® et ne sont pas modifiés chimiquement. Selon les expériences, différents siRNA sont utilisés, leurs séquences sont décrites dans le Tableau 21, et les quantités utilisées sont précisées pour chaque expérience.

Selon les expériences, deux plasmides ont été utilisés : le pXL3296 (Schlegel et al., 2013b), ne contenant pas de cassettes d'expression eucaryote, ou le plasmide Col-myc (MG53507-CM, Sino Biological Inc). Les deux plasmides sont dépourvus de séquences CpG, susceptibles

d'induire des réponses immunitaires. Les préparations plasmidiques m'ont été fournies par le Dr. Virginie ESCRIOU et Anne-Marie LACHAGES.

siRNA	Orientation	Séquence
siCtrl (ou siRNA-Alexa488 ou siRNA-Alexa647)	Brin sens	5'- UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UdTdT-3'
	Brin antisens	5'- ACG-UGA-CAC-GUU-CGG-AGA-AdGdG-3'
siLuc	Brin sens	5'- CUU-ACG-CUG-AGU-ACU-UCG-AdTdT-3'
	Brin antisens	5'- UCG-AAG-UAC-UCA-GCG-UAA-GdTdT-3'
si1Col	Brin sens	5'- GAG-GUA-UGC-UUG-AUC-UGU-AdTdT-3'
	Brin antisens	5'- UAC-AGA-UCA-AGC-AUA-CCU-CdGdG-3'
si2Col	Brin sens	5'- GGA-AGA-AUA-CGU-AUC-ACC-AdTdT-3'
	Brin antisens	5'- UGG-UGA-UAC-GUA-UUC-UUC-CdGdG-3'
si3Col	Brin sens	5'- GUC-AAG-ACA-UGU-UCA-GCU-UdTdT-3'
	Brin antisens	5'- AAG-CUG-AAC-AUG-UCU-AGA-CdTdT-3'
si4Col	Brin sens	5'- GAU-GUC-CUA-UGG-CUA-UGA-UdTdT-3'
	Brin antisens	5'- AUC-AUA-GCC-AUA-GGA-CAU-CdTdT-3'
si5Col	Brin sens	5'- GUC-AGC-AGA-UUG-AGA-ACA-UdTdT-3'
	Brin antisens	5'- AUG-UUC-UCA-AUC-UGC-UGA-CdTdT-3'
si6Col	Brin sens	5'- CAA-GGU-CCU-UCU-GGA-UCA-AdTdT-3'
	Brin antisens	5'- UUG-AUC-CAG-AAG-GAC-CUU-GdTdT-3'

Tableau 21 : Séquences des différents siRNA utilisés pour la transfection des cellules et les injections des souris.

La modification avec le fluorophore est effectuée à l'extrémité 5' du brin sens du siRNA non spécifique (siCtrl).

5.3 Mesure de la taille des liposomes et lipoplexes

Le diamètre hydrodynamique des liposomes et des lipoplexes de siRNA à différents R+/- est mesuré par DLS (diffusion dynamique de la lumière) en utilisant l'appareil Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). Pour cela, 4 µl de liposome ou de lipoplexes, à 20 mM de lipide cationique et à 5ng de siRNA/µl, à différents R +/- sont dilués dans 400 µl d'eau filtrée, agités par vortex puis transférés dans une cuve en plastique qui est introduite dans l'appareil. Trois mesures sont effectuées pour chaque échantillon. Les diamètres hydrodynamiques des liposomes ou lipoplexes sont donnés en nm. Un indice de polydispersité est également indiqué et est compris entre 0 et 1.

6. Techniques de biologie cellulaire

6.1 Culture cellulaire

Les cellules utilisées sont :

- Les HSCs primaires de souris C57BL/6J
- La lignée de mélanome de souris B16
- Les cellules B16Luc : ce sont des cellules B16 modifiées, ayant intégré le gène de la luciférase. Pour leur sélection, ces cellules possèdent également un gène de résistance à la généticine.

Toutes les cellules sont cultivées dans une étuve humidifiée (5% de CO₂, 37°C). Les cellules sont maintenues en culture jusqu'à ce qu'elles atteignent 80% de confluence, puis sont détachées de leur support en utilisant la trypsine-EDTA (0,05%, Gibco, 25300-054). En fonction de la durée de la culture, les cellules sont réensemencées à différentes dilutions. Toutes les cellules sont cultivées dans un milieu de culture complet constitué de DMEM 1X, GlutaMAX (Gibco, 31966-021), supplémenté de 10% (v/v) de sérum de veau foetal (Sigma-Aldrich®, F7524) et contenant 100 U/ml de Pénicilline et 100 µg/ml Streptomycine. La généticine (2 mg/ml, Gibco, 10131-019) est ajoutée dans le milieu de culture des cellules B16Luc, pour conserver les cellules ayant le gène de sélection.

6.2 Immuno-cyto-fluorescence

Après purification des HSCs, les cellules sont ensemencées sur des lamelles en verre stériles à une densité de 30.000 cellules/puits. Le milieu de culture est changé quotidiennement et une immuno-cyto-fluorescence est réalisée après 24h, 7 ou 14 jours de mise en culture. Après aspiration du milieu de culture, les cellules sont d'abord rincées avec 1 ml de PBS, puis fixées pendant 10 min avec 300 µl de PFA 2%. Après 3 rinçages de 5 min avec 1 ml de PBS, les cellules sont perméabilisées avec 300 µl de PBS-TritonX100 0,1% (v/v), pendant 10 min, puis rincées à nouveau, 3 fois au PBS. Les sites non spécifiques sont ensuite saturés avec 300 µl de PBS-BSA 1% (p/v), pendant 30 min. Après trois lavages au PBS, les cellules sont incubées, pendant 2h à température ambiante, avec 300 µl d'anticorps primaire, anti- α -SMA (ab124964, 1/500^e), anti-desmine (ab15200, 1/500^e) ou anti-c-RBP1 (ab15488, 1/100^e) dilué dans du PBS-BSA 1% (p/v) Tween20 0,05% (v/v). Un contrôle négatif est également réalisé en incubant les cellules avec 300 µl de sérum de lapin (Life Technologies, 10500C) dilué dans du PBS-Tween20 0,05% (v/v), à la même concentration que l'anticorps primaire. Trois lavages, sous agitation, avec 1 ml de PBS-Tween20 0,05%, sont ensuite réalisés avant l'incubation des cellules, pendant 1h à température ambiante, avec 300 µl d'anticorps secondaire AlexaFluor647 chèvre anti-lapin (Life Technologies, A21244) dilué au 1/500^e dans du PBS-BSA 1% (p/v). Les cellules sont à nouveau rincées sous agitation, 3 fois avec 1 ml de PBS. Un montage entre lame et lamelle est ensuite réalisé comme décrit pour les coupes histologiques.

6.3 Transfection des cellules B16Luc

Des cellules B16Luc sont ensemencées, dans une plaque 24 puits, à une densité de 5.10⁴ cellules par puits (dans 1 ml de milieu). Après 24h de mise en culture, des lipoplexes sont préparés comme décrit ci-dessus (voir 5.2 Préparation des lipoplexes de siRNA). Le siRNA utilisé est un siRNA dirigé contre la luciférase (siLuc) et le plasmide est le pXL 3296. Les deux sont utilisés à une concentration de 0,5 µg/ml (37,6 nM) par puits. Sept formulations différentes

de liposomes ont été utilisées (voir Tableau 20) à cinq $R_{+/-} = 2, 4, 6, 8$ ou 10). Les lipoplexes formés sont ensuite mélangés avec du milieu de culture complet (100 μ l de lipoplexes pour 1ml de milieu de culture). Les cellules sont ensuite incubées en présence de lipoplexes pendant 24h puis le milieu de culture est renouvelé. Un dosage de l'activité de la luciférase est réalisé 48h après le début de la transfection (voir 4.5 Dosage de l'activité de la luciférase). L'expérience est répétée trois fois pour chaque condition.

6.4 Validation des séquences de siRNA anti-Col1 α 1

Des cellules B16 sontensemencées, dans une plaque 24 puits, à une densité de $4 \cdot 10^4$ cellules par puits. Après 24h de mise en culture, la transfection des cellules est réalisée. Pour cela, des lipoplexes sont préparés comme décrit ci-dessus (voir 5.2 Préparation des lipoplexes de siRNA), avec le liposome DMAPAP/DOPE à un $R_{+/-} = 6$. Sept lipoplexes différents sont préparés soit avec l'une des six séquences de siRNA dirigés contre Col1 α 1, soit avec un siRNA non spécifique. Toutes les séquences sont décrites dans le Tableau 21. Le plasmide utilisé est le plasmide Col-myc codant une protéine de fusion Col1 α 1 composée de la molécule du collagène de type 1 (Col1 α 1) liée à l'étiquette myc. Les siRNA et le plasmide sont utilisés chacun à une concentration de 0,3 μ g/ml (22,6 nM) par puits. Les lipoplexes formés sont mélangés avec du milieu de culture complet (100 μ l de lipoplexes pour 1 ml de milieu de culture). Les cellules sont incubées en présence de lipoplexes pendant 24h. Le milieu de culture est renouvelé et la transfection est arrêtée après 48h. Un immunomarquage de la protéine de fusion Col-myc est réalisé comme décrit ci-dessus (voir 6.2 Immuno-cytofluorescence), en incubant les cellules pendant 1h avec un anticorps primaire monoclonal anti-c-myc (9E10), produit chez la souris (Santa Cruz Biotechnology, sc-40, 1/200^e), puis avec l'anticorps secondaire anti-souris, produit chez la chèvre (Alexa Fluor 488, Invitrogen, A11001, 1/1000^e). Les cellules sont marquées au DAPI (1 μ g/ml, Sigma-Aldrich, D1388) pendant 5 min à température ambiante, puis rincées sous agitation, avec 1 ml de PBS-Tween20 0,05% (v/v), suivi de 1 ml PBS. 200 μ l de PBS par puits sont ajoutés avant l'observation des cellules au microscope à fluorescence. Une quantification des cellules présentant un signal fluorescent lié au marquage de myc sur le nombre de cellules total est ensuite réalisée sur au moins 5 champs microscopiques pour chaque condition. Les efficacités d'inhibition de chaque séquence de siRNA anti-Col1 α 1 sont calculées par rapport aux cellules transfectées avec le plasmide Col-myc et le siCtrl. Un schéma illustrant le modèle cellulaire développé est présenté dans la Figure 110 page 253.

6.5 Immunomarquage des cellules hépatiques et analyse par cytométrie en flux

Le culot de cellules hépatiques obtenu après dissociation enzymatique *in situ* du foie est repris dans 20 ml de tampon de digestion sans enzymes. Une centrifugation (600g, 15min, 4°C) est réalisée. Après élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 5 ml de PBS, puis comptées au microscope optique. Des dilutions sont réalisées dans du PBS pour obtenir environ 300.000 cellules/ml. La suspension cellulaire est ensuite répartie en plusieurs tubes contenant 100 µl chacun, centrifugée (600g, 5min, 4°C), puis le surnageant est éliminé. Pour le marquage de la desmine, une étape supplémentaire est nécessaire pour perméabiliser les cellules qui consiste à remettre les cellules en suspension, pendant 30 min à température ambiante, dans 100 µl de PBS-BSA 1% (p/v) TritonX100 0,1% (v/v) suivie d'une étape de centrifugation (600g, 5min, 4°C). Pour tous les marquages, les cellules sont ensuite remises en suspension dans 100 µl de PBS-BSA 1% (p/v) contenant 1 µl d'anticorps primaire (Tableau 22) et incubées pendant 30 min à température ambiante. Un contrôle négatif est réalisé pour chaque type de marquage en incubant les cellules avec le sérum de l'espèce chez laquelle l'anticorps primaire a été produit, à la même concentration que celle de l'anticorps primaire (Tableau 22). Après centrifugation (600g, 5min, 4°C) et élimination du surnageant, les cellules sont rincées dans 1 ml de PBS-BSA 1% (p/v), puis centrifugées à nouveau (600g, 5min, 4°C). Le surnageant est éliminé et 100 µl de PBS-BSA 1% contenant 1 µl d'anticorps secondaire (Tableau 22) sont ajoutés. Après 30 min d'incubation à température ambiante, les cellules sont à nouveau rincées dans 1 ml de PBS-BSA 1%, puis remises en suspension, après centrifugation (600g, 5min, 4°C), dans 500 µl de PBS-BSA 1%.

Anticorps primaire (espèce, référence)	Anticorps secondaire	Isotype
F4/80 (A3-1) (Rat, Santa Cruz Biotechnology, sc-59171)	Chèvre anti-rat (AlexaFluor 647, Life Technologies, A 21247, 5 mole dye/mol)	IgG de rat (Invitrogen, 10710C)
CD31 (rat, BD Pharmingen, 550274)		
ASGPR (Lapin, Santa Cruz Biotechnology inc, sc-28577)	Chèvre anti-lapin (AlexaFluor 647, Life Technologies, A 21246, 3 mole dye/mol)	IgG de lapin (Life Technologies, 10500C)
Desmine (lapin, abcam, 15200)		

Tableau 22 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immunomarquage des cellules hépatiques.

Les cellules hépatiques marquées sont analysées à l'aide d'un cytomètre en flux de type Guava EasyCyte 6-2L. Cet instrument est équipé de deux lasers (488 nm et 640 nm), de filtres à 525 nm pour la détection de la fluorescence verte (Green Fluorescence, excitation 488nm) et 583 nm pour la détection de la fluorescence jaune (Yellow Fluorescence, excitation 488nm), ainsi que d'un filtre à 661 nm pour la détection de la fluorescence rouge lointain (Red2 Fluorescence, excitation 640 nm). Pour toutes les analyses, 50 000 événements ont été acquis

avec un flux de 0,59 $\mu\text{l/s}$, en utilisant le logiciel d'analyse et d'acquisition GuavaSoft, Incyte 2.2.

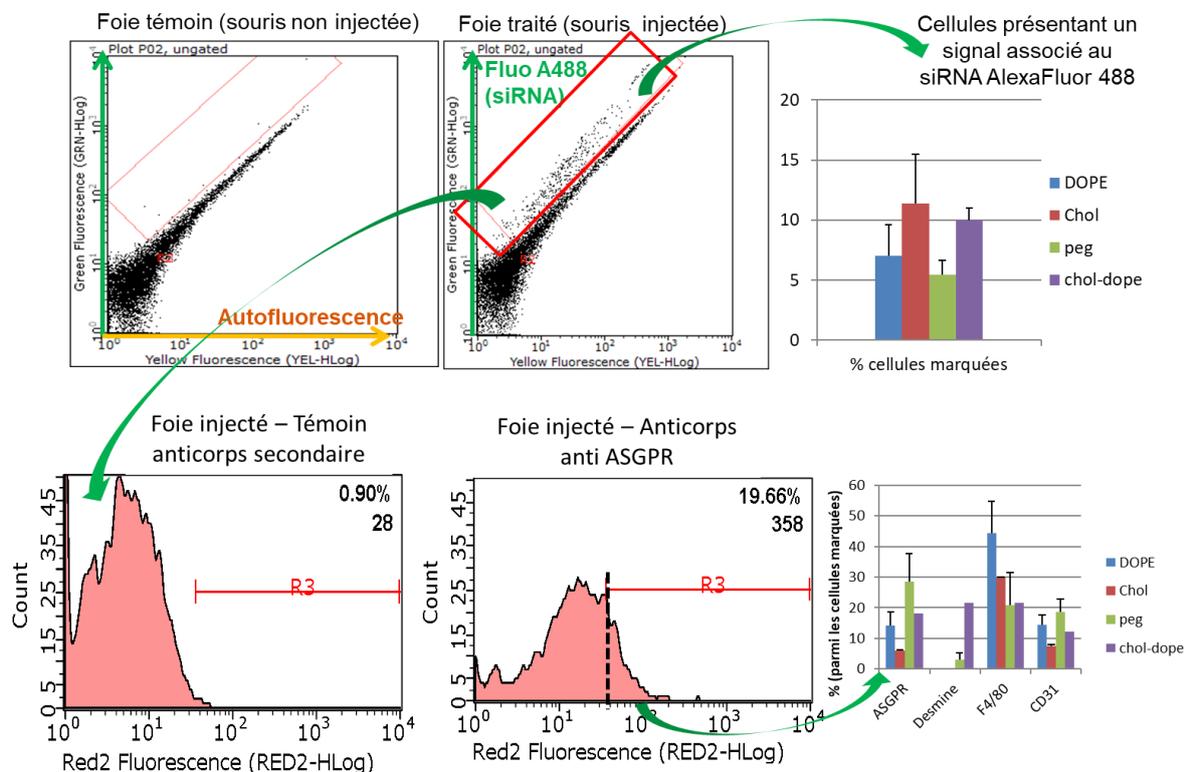


Figure 122 : Analyse par cytométrie en flux des cellules hépatiques de souris injectées avec les siRNA fluorescents.

Afin d'identifier les cellules hépatiques présentant un signal associé au siRNA-Alexa 488, une zone d'intérêt est définie sur un dot-plot présentant la fluorescence verte en fonction de la fluorescence jaune (auto-fluorescence). On voit sur la Figure 122 que dans cette zone, il n'y a pas de cellules présentant un signal si on analyse les cellules hépatiques d'une souris non injectée. On en déduit le pourcentage des cellules présentant un signal associé au siRNA-Alexa 488 (ou les cellules ayant internalisé les siRNA). On analyse ensuite le signal associé à l'Alexa647 (marquage anticorps) pour cette population de cellules présentant une fluorescence verte. Le pourcentage de cellules présentant un marquage spécifique du type cellulaire est déterminé par rapport au témoin négatif sans anticorps primaire (c-à-d. les cellules hépatiques de souris injectées, incubées avec l'isotype et l'anticorps secondaire) (Figure 122). Cette analyse est réalisée pour chaque immuno-marquage et chaque formulation injectée et répétée pour chaque souris (Tableau 16).

7. Imagerie

7.1 Microscopie optique

Un microscope optique Leica DM4000B situé sur la plateforme d'imagerie de la faculté de pharmacie a été utilisé afin d'observer les lames histologiques colorées. Les images sont réalisées avec une caméra DFC420 et à l'aide du logiciel LAS Leica Application Suite.

7.2 Microscopie confocale

Les images des coupes d'immunohistochimie et d'immunocytofluorescence des HSCs sont obtenues à l'aide du microscope confocal Zeiss LSM 700 de l'UTechS BioImagerie Photonique de l'institut Pasteur, ou du microscope confocal Leica TCS SP8 situé à la plateforme d'Imagerie Cellulaire et Moléculaire de la faculté de pharmacie.

7.3 Microscopie de fluorescence

L'observation des cellules stellaires purifiées et des cellules B16 immuno-marquées avec l'anti-myc est effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss Axiophot) équipé d'une caméra CCD (Retiga 2000, Q-Imaging) et l'acquisition des images s'est faite avec le logiciel QCapture.

7.4 Microscopie multi-photonique

La microscopie multi-photonique est réalisée, sur des coupes « blanches » non traitées, en utilisant un microscope à balayage laser LSM 710NLO (Zeiss) équipé d'un objectif sec 20x avec une ouverture numérique de 0,8 (Achromplan; Zeiss) couplé à un laser pulsé Chameleon Ultra II Ti-Sapphire (Coherent). Les coupes hépatiques sont entièrement scannées, puis une mosaïque est constituée à partir de multiples images de 512 x 512 pixels (212,5 x 212,5 μm) (avec un chevauchement de 10%) afin de reconstruire l'image de la coupe entière. Chaque coupe hépatique est scannée également en Z stack avec un espacement de 3 μm entre chaque plan. Le laser multiphoton a été réglé à 810 nm. Les signaux sont collectés à l'aide de détecteurs non descannés (NDD, Zeiss). Le signal de génération de seconde harmonique (SHG) est détecté à travers un filtre de bande passante de 395 à 425 nm d'un détecteur non descanné. Le signal de fluorescence des rétinoïdes (RF) est détecté simultanément à travers un filtre de bande passante de 500 à 550 nm. L'analyse quantitative des images de microscopie multi-photonique a été réalisée grâce à une macro développée par Dr. Anne Danckaert sous Fiji (NIH, Bethesda, MD, États-Unis).

7.5 Analyse spectrale

Les images ont été générées sur un microscope confocal SP8 (Leica) (objectif x20, ouverture numérique = 0,75) en mode de balayage spectral. Les échantillons sont excités séquentiellement avec un laser à 405 nm et le signal d'émission est détecté entre 420 nm et 650 nm avec une fenêtre spectrale de 5 nm puis avec un laser à 480 nm et le signal d'émission est détecté entre 490 nm et 790 nm avec une fenêtre spectrale de 5 nm. En sélectionnant des régions d'intérêt sur le tissu (l'auto-fluorescence tissulaire) ou sur le signal des gouttelettes de rétinoïdes, nous avons généré des spectres spécifiques. Pour chaque échantillon (HSCs primaires, tissu hépatique de souris et biopsies humaines non colorés), nous avons acquis des images en mode de balayage spectral et effectué, par la suite, une séparation spectrale des signaux, en utilisant l'outil du logiciel Leica Application Software X (module Dye Finder). Afin d'obtenir le spectre des gouttelettes de rétinoïdes, nous nous sommes basés sur le signal spécifique des rétinoïdes généré avec des cultures primaires de HSCs. Ce protocole nous a permis d'obtenir à la fois les spectres d'émission de fluorescence et les images séparées de l'auto-fluorescence tissulaire et du signal des rétinoïdes sur tous les échantillons analysés. Pour l'analyse d'images de biopsie humaine, nous avons réalisé une séparation spectrale du signal des rétinoïdes, basée sur les spectres spécifiques des rétinoïdes de HSCs primaires, ce qui nous a permis de confirmer que le signal fluorescent observé est spécifique des rétinoïdes.

8. Etude statistique

Prism 6.0 (GraphPad Software Inc. ©, USA) ou Excel ont été utilisés pour l'analyse statistique. Les données ont été analysées par le test de Mann-Whitney ou le test de Kruskal-Wallis. Le coefficient de corrélation de Spearman a été calculé dans Excel. Le nombre de répétitions et le test statistique utilisé pour chaque ensemble de données sont indiqués dans les légendes des figures. La signification statistique est indiquée sur les graphiques par des astérisques (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0005$).

Références bibliographiques

- Adesina, S.K., and Akala, E.O. (2015). Nanotechnology Approaches for the Delivery of Exogenous siRNA for HIV Therapy. *Mol. Pharmaceutics* 12, 4175–4187.
- Akcora, B.Ö., Storm, G., and Bansal, R. (2018). Inhibition of canonical WNT signaling pathway by β -catenin/CBP inhibitor ICG-001 ameliorates liver fibrosis in vivo through suppression of stromal CXCL12. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864, 804–818.
- Akhtar, S., and Benter, I.F. (2007). Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J Clin Invest* 117, 3623–3632.
- Akinc, A., Maier, M.A., Manoharan, M., Fitzgerald, K., Jayaraman, M., Barros, S., Ansell, S., Du, X., Hope, M.J., Madden, T.D., et al. (2019). The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nature Nanotechnology* 14, 1084–1087.
- Al Shaer, D., Al Musaimi, O., Albericio, F., and de la Torre, B.G. (2020). 2019 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceutics (Basel)* 13.
- Alkhoury, N., Dixon, L.J., and Feldstein, A.E. (2009). Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 3, 445–451.
- Anty, R., and Gual, P. (2019). [Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease]. *Presse Med* 48, 1468–1483.
- Aoyama, T., Paik, Y.-H., Watanabe, S., Laleu, B., Gaggini, F., Fioraso-Cartier, L., Molango, S., Heitz, F., Merlot, C., Szyndralewicz, C., et al. (2012). Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in experimental liver fibrosis: GKT137831 as a novel potential therapeutic agent. *Hepatology* 56, 2316–2327.
- Armstrong, M.J., Gaunt, P., Aithal, G.P., Barton, D., Hull, D., Parker, R., Hazlehurst, J.M., Guo, K., Abouda, G., Aldersley, M.A., et al. (2016). Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *The Lancet* 387, 679–690.
- Arriazu, E., Ruiz de Galarreta, M., Cubero, F.J., Varela-Rey, M., Pérez de Obanos, M.P., Leung, T.M., Lopategi, A., Benedicto, A., Abraham-Enachescu, I., and Nieto, N. (2014). Extracellular Matrix and Liver Disease. *Antioxid Redox Signal* 21, 1078–1097.
- Arruda, D.C., Gonzalez, I.J., Finet, S., Cordova, L., Trichet, V., Andrade, G.F., Hoffmann, C., Bigey, P., de Almeida Macedo, W.A., Da Silva Cunha, A., et al. (2019). Modifying internal organization and surface morphology of siRNA lipoplexes by sodium alginate addition for efficient siRNA delivery. *Journal of Colloid and Interface Science* 540, 342–353.
- Ashla, A.A., Hoshikawa, Y., Tsuchiya, H., Hashiguchi, K., Enjoji, M., Nakamuta, M., Taketomi, A., Maehara, Y., Shomori, K., Kurimasa, A., et al. (2010). Genetic analysis of expression profile involved in retinoid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Res.* 40, 594–604.
- Aydın, M.M., and Akçalı, K.C. (2018). Liver fibrosis. *Turk J Gastroenterol* 29, 14–21.
- Babu, A., Munshi, A., and Ramesh, R. (2017). Combinatorial Therapeutic Approaches with RNAi and Anticancer Drugs Using Nanodrug Delivery Systems. *Drug Dev Ind Pharm* 43, 1391–1401.
- Baek, C., Wei, X., Bartneck, M., Fech, V., Heymann, F., Gassler, N., Hittatiya, K., Eulberg, D., Luedde, T., Trautwein, C., et al. (2014). Pharmacological inhibition of the chemokine C-C

- motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6C+ macrophage infiltration in mice. *Hepatology* 59, 1060–1072.
- Baghy, K., Tátrai, P., Regős, E., and Kovalszky, I. (2016). Proteoglycans in liver cancer. *World J Gastroenterol* 22, 379–393.
- Baiocchini, A., Montaldo, C., Conigliaro, A., Grimaldi, A., Correani, V., Mura, F., Ciccocanti, F., Rotiroti, N., Brenna, A., Montalbano, M., et al. (2016). Extracellular Matrix Molecular Remodeling in Human Liver Fibrosis Evolution. *PLOS ONE* 11, e0151736.
- Bajan, S., and Hutvagner, G. (2020). RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells* 9, 137.
- Balazs, D.A., and Godbey, W. (2011). Liposomes for Use in Gene Delivery. *J Drug Deliv* 2011.
- Ballarín-González, B., Dagnaes-Hansen, F., Fenton, R.A., Gao, S., Hein, S., Dong, M., Kjems, J., and Howard, K.A. (2013). Protection and Systemic Translocation of siRNA Following Oral Administration of Chitosan/siRNA Nanoparticles. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2, e76.
- Balmaceda, J.B., J, A., O, B., Cs, C., C, C., M, M., R, S., C, G., S, K., E, R., et al. (2019). Long-term changes in hepatic fibrosis following hepatitis C viral clearance in patients with and without HIV. *Antivir Ther* 24, 451–457.
- Bangen, J.-M., Hammerich, L., Sonntag, R., Baues, M., Haas, U., Lambertz, D., Longerich, T., Lammers, T., Tacke, F., Trautwein, C., et al. (2017). Targeting CCl4-induced liver fibrosis by RNA interference-mediated inhibition of cyclin E1 in mice. *Hepatology* 66, 1242–1257.
- Bansal, R., Prakash, J., Post, E., Beljaars, L., Schuppan, D., and Poelstra, K. (2011a). Novel engineered targeted interferon-gamma blocks hepatic fibrogenesis in mice. *Hepatology* 54, 586–596.
- Bansal, R., Prakash, J., Ruijter, M. de, Beljaars, L., and Poelstra, K. (2011b). Peptide-Modified Albumin Carrier Explored as a Novel Strategy for a Cell-Specific Delivery of Interferon Gamma To Treat Liver Fibrosis. *Mol. Pharmaceutics* 8, 1899–1909.
- Bansal, R., Nagórniewicz, B., and Prakash, J. (2016). Clinical Advancements in the Targeted Therapies against Liver Fibrosis. *Mediators of Inflammation* 2016, 1–16.
- Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., McCauley, S., Rodriguez, H.M., Oyasu, M., Mikels, A., Vaysberg, M., Ghermazien, H., Wai, C., et al. (2010). Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nature Medicine* 16, 1009–1017.
- Bartlett, D.W., and Davis, M.E. (2007). Physicochemical and Biological Characterization of Targeted, Nucleic Acid-Containing Nanoparticles. *Bioconjugate Chem.* 18, 456–468.
- Bataller, R., and Brenner, D.A. (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115, 209–218.
- Bechmann, L.P., Hannivoort, R.A., Gerken, G., Hotamisligil, G.S., Trauner, M., and Canbay, A. (2012). The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of Hepatology* 56, 952–964.
- Beljaars, L., Molema, G., Weert, B., Bonnema, H., Olinga, P., Groothuis, G.M., Meijer, D.K., and Poelstra, K. (1999). Albumin modified with mannose 6-phosphate: A potential carrier for selective delivery of antifibrotic drugs to rat and human hepatic stellate cells. *Hepatology* 29, 1486–1493.

- Beljaars, L., Molema, G., Schuppan, D., Geerts, A., Bleser, P.J.D., Weert, B., Meijer, D.K.F., and Poelstra, K. (2000). Successful Targeting to Rat Hepatic Stellate Cells Using Albumin Modified with Cyclic Peptides That Recognize the Collagen Type VI Receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 12743–12751.
- Beljaars, L., Weert, B., Geerts, A., Meijer, D.K.F., and Poelstra, K. (2003). The preferential homing of a platelet derived growth factor receptor-recognizing macromolecule to fibroblast-like cells in fibrotic tissue. *Biochemical Pharmacology* 66, 1307–1317.
- Bellocq, N.C., Pun, S.H., Jensen, G.S., and Davis, M.E. (2003). Transferrin-Containing, Cyclodextrin Polymer-Based Particles for Tumor-Targeted Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* 14, 1122–1132.
- Benyon, R.C., and Iredale, J.P. (2000). Is liver fibrosis reversible? *Gut* 46, 443–446.
- Beuge, M.M. van, Prakash, J., Lacombe, M., Gosens, R., Post, E., Reker-Smit, C., Beljaars, L., and Poelstra, K. (2011). Reduction of Fibrogenesis by Selective Delivery of a Rho Kinase Inhibitor to Hepatic Stellate Cells in Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 337, 628–635.
- Bhogal, R.K., Stoica, C.M., McGaha, T.L., and Bona, C.A. (2005). Molecular Aspects of Regulation of Collagen Gene Expression in Fibrosis. *Journal of Clinical Immunology* 25, 592–603.
- Blaner, W.S., O’Byrne, S.M., Wongsiriroj, N., Kluwe, J., D’Ambrosio, D.M., Jiang, H., Schwabe, R.F., Hillman, E.M.C., Piantedosi, R., and Libien, J. (2009). Hepatic stellate cell lipid droplets: A specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791, 467–473.
- Borkham-Kamphorst, E., and Weiskirchen, R. (2016). The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 28, 53–61.
- Botella-Carretero, J.I., Balsa, J.A., Vázquez, C., Peromingo, R., Díaz-Enriquez, M., and Escobar-Morreale, H.F. (2010). Retinol and α -Tocopherol in Morbid Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *OBES SURG* 20, 69–76.
- Breitkopf, K., Roeyen, C., Sawitza, I., Wickert, L., Floege, J., and Gressner, A. (2005). Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors α and β in activated rat hepatic stellate cells (HSC). *Cytokine* 31, 349–357.
- Brenner, D.A., Kisseleva, T., Scholten, D., Paik, Y.H., Iwaisako, K., Inokuchi, S., Schnabl, B., Seki, E., De Minicis, S., Oesterreicher, C., et al. (2012). Origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5, S17.
- Bril, F., Kalavalapalli, S., Clark, V.C., Lomonaco, R., Soldevila-Pico, C., Liu, I.-C., Orsak, B., Tio, F., and Cusi, K. (2018). Response to Pioglitazone in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis With vs Without Type 2 Diabetes. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 16, 558-566.e2.
- Brun, P., Castagliuolo, I., Pinzani, M., Palù, G., and Martines, D. (2005). Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 289, G571–G578.
- Brunt, E.M., and Neuschwander-Tetri, B.A. (1999). Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions. 94, 8.

- Buck, J., Grossen, P., Cullis, P.R., Huwyler, J., and Witzigmann, D. (2019). Lipid-Based DNA Therapeutics: Hallmarks of Non-Viral Gene Delivery. *ACS Nano* 13, 3754–3782.
- Budas, G., Karnik, S., Jonnson, T., Shafizadeh, T., Watkins, S., Breckenridge, D., and Tumas, D. (2016). Reduction of Liver Steatosis and Fibrosis with an Ask1 Inhibitor in a Murine Model of Nash is Accompanied by Improvements in Cholesterol, Bile Acid and Lipid Metabolism. *Journal of Hepatology* 64, S170.
- Busignies, V., Charrueau, C., Tchoreloff, P., and Escriou, V. (2017). Chapter 6 - Nanostructures for oral delivery of therapeutic nucleic acids. In *Nanostructures for Oral Medicine*, E. Andronescu, and A.M. Grumezescu, eds. (Elsevier), pp. 147–172.
- Caballería, L., Pera, G., Arteaga, I., Rodríguez, L., Alumà, A., Morillas, R.M., Ossa, N. de la, Díaz, A., Expósito, C., Miranda, D., et al. (2018). High Prevalence of Liver Fibrosis Among European Adults With Unknown Liver Disease: A Population-Based Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 16, 1138-1145.e5.
- Caillaud, M., El Madani, M., and Massaad-Massade, L. (2020). Small interfering RNA from the lab discovery to patients' recovery. *Journal of Controlled Release* 321, 616–628.
- Caldwell, S., Ikura, Y., Dias, D., Isomoto, K., Yabu, A., Moskaluk, C., Pramoonjago, P., Simmons, W., Scruggs, H., Rosenbaum, N., et al. (2010). Hepatocellular Ballooning in NASH. *J Hepatol* 53, 719–723.
- Caldwell, S., Lackner, C., Caldwell, S., and Lackner, C. (2017). Perspectives on NASH Histology: Cellular Ballooning. *Annals of Hepatology* 16, 182–184.
- Calvente, C.J., Sehgal, A., Popov, Y., Kim, Y.O., Zevallos, V., Sahin, U., Diken, M., and Schuppan, D. (2015). Specific hepatic delivery of procollagen α 1(I) siRNA in lipid-like nanoparticles resolves liver fibrosis. *Hepatology* 62, 1285–1297.
- Campana, L., and Iredale, J.P. (2017). Regression of Liver Fibrosis. *Semin Liver Dis* 58, 1–10.
- Campbell, J.S., Hughes, S.D., Gilbertson, D.G., Palmer, T.E., Holdren, M.S., Haran, A.C., Odell, M.M., Bauer, R.L., Ren, H.-P., Haugen, H.S., et al. (2005). Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3389–3394.
- Canbay, A., Feldstein, A., Baskin-Bey, E., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2004). The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 1191–1196.
- Cassiman, D., van Pelt, J., De Vos, R., Van Lommel, F., Desmet, V., Yap, S.-H., and Roskams, T. (1999). Synaptophysin: A Novel Marker for Human and Rat Hepatic Stellate Cells. *Am J Pathol* 155, 1831–1839.
- Castera, L. (2018). Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Non-invasive tests are enough. *Liver Int* 38, 67–70.
- Cavallaro, G., Sardo, C., Craparo, E.F., Porsio, B., and Giammona, G. (2017). Polymeric nanoparticles for siRNA delivery: Production and applications. *International Journal of Pharmaceutics* 525, 313–333.
- Chai, N.-L., Fu, Q., Shi, H., Cai, C.-H., Wan, J., Xu, S.-P., and Wu, B.-Y. (2012). Oxymatrine liposome attenuates hepatic fibrosis via targeting hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 18, 4199–4206.

- Chalasani, N., Garcia-Tsao, G., Goodman, Z., Lawitz, E., Abdelmalek, M., Rinella, M., Ryan, M., Noureddin, M., Jue, C., Pyko, M., et al. (2018). A multicenter, randomized, double-blind, PLB-controlled trial of Galectin-3 inhibitor (GR-MD-02) in patients with NASH cirrhosis and portal hypertension. *Journal of Hepatology* 68, S100–S101.
- Chalasani, N., Abdelmalek, M.F., Garcia-Tsao, G., Vuppalanchi, R., Alkhouri, N., Rinella, M., Noureddin, M., Pyko, M., Shiffman, M., Sanyal, A., et al. (2020). Effects of Belapectin, an Inhibitor of Galectin-3, in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis With Cirrhosis and Portal Hypertension. *Gastroenterology* 158, 1334-1345.e5.
- Chandela, A., and Ueno, Y. (2019). Systemic Delivery of Small Interfering RNA Therapeutics: Obstacles and Advances. *Reviews in Agricultural Science* 7, 10–28.
- Chang, P.E., Goh, G.B.B., Leow, W.Q., Shen, L., Lim, K.H., and Tan, C.K. (2018). Second harmonic generation microscopy provides accurate automated staging of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 13.
- Charlton, M., Krishnan, A., Viker, K., Sanderson, S., Cazanave, S., McConico, A., Masuoko, H., and Gores, G. (2011). Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 301, G825–G834.
- Chaves, G.V., Pereira, S.E., Saboya, C.J., Spitz, D., Rodrigues, C.S., and Ramalho, A. (2014). Association Between Liver Vitamin A Reserves and Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the Class III Obese Following Bariatric Surgery. *OBES SURG* 24, 219–224.
- Chen, J., Wall, N.R., Kocher, K., Duclos, N., Fabbro, D., Neuberg, D., Griffin, J.D., Shi, Y., and Gilliland, D.G. (2004). Stable expression of small interfering RNA sensitizes TEL-PDGFR β to inhibition with imatinib or rapamycin. *J Clin Invest* 113, 1784–1791.
- Chen, S.-W., Zhang, X.-R., Wang, C.-Z., Chen, W.-Z., Xie, W.-F., and Chen, Y.-X. (2008). RNA interference targeting the platelet-derived growth factor receptor β subunit ameliorates experimental hepatic fibrosis in rats. *Liver International* 28, 1446–1457.
- Chen, W., Li, H., Liu, Z., and Yuan, W. (2016). Lipopolyplex for Therapeutic Gene Delivery and Its Application for the Treatment of Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 8.
- Chen, X., Mangala, L.S., Rodriguez-Aguayo, C., Kong, X., Lopez-Berestein, G., and Sood, A.K. (2018). RNA Interference–Based Therapy and Its Delivery Systems. *Cancer Metastasis Rev* 37, 107–124.
- Chen, Y.-N., Hsu, S.-L., Liao, M.-Y., Liu, Y.-T., Lai, C.-H., Chen, J.-F., Nguyen, M.-H.T., Su, Y.-H., Chen, S.-T., and Wu, L.-C. (2017a). Ameliorative Effect of Curcumin-Encapsulated Hyaluronic Acid–PLA Nanoparticles on Thioacetamide-Induced Murine Hepatic Fibrosis. *Int J Environ Res Public Health* 14.
- Chen, Z., Jin, W., Liu, H., Zhao, Z., and Cheng, K. (2015). Discovery of Peptide Ligands for Hepatic Stellate Cells Using Phage Display. *Mol Pharm* 12, 2180–2188.
- Chen, Z., Liu, H., Jain, A., Zhang, L., Liu, C., and Cheng, K. (2017b). Discovery of Aptamer Ligands for Hepatic Stellate Cells Using SELEX. *Theranostics* 7, 2982–2995.
- Chen, Z., Jain, A., Liu, H., Zhao, Z., and Cheng, K. (2019). Targeted Drug Delivery to Hepatic Stellate Cells for the Treatment of Liver Fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 370, 695–702.

- Cheng, K., and Mahato, R.I. (2007). Gene Modulation for Treating Liver Fibrosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 24, 93–146.
- Chiba, T., Suzuki, S., Sato, Y., Itoh, T., and Umegaki, K. (2016). Evaluation of Methionine Content in a High-Fat and Choline-Deficient Diet on Body Weight Gain and the Development of Non-Alcoholic Steatohepatitis in Mice. *PLoS ONE* 11, e0164191.
- Chiu, Y.-L., Ali, A., Chu, C., Cao, H., and Rana, T.M. (2004). Visualizing a Correlation between siRNA Localization, Cellular Uptake, and RNAi in Living Cells. *Chemistry & Biology* 11, 1165–1175.
- Cogger, V.C., Warren, A., Fraser, R., Ngu, M., McLean, A.J., and Le Couteur, D.G. (2003). Hepatic sinusoidal pseudocapillarization with aging in the non-human primate. *Experimental Gerontology* 38, 1101–1107.
- Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. (2011). Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science* 332, 1519–1523.
- Cong, M., Liu, T., Wang, P., Fan, X., Yang, A., Bai, Y., Peng, Z., Wu, P., Tong, X., Chen, J., et al. (2013). Antifibrotic Effects of a Recombinant Adeno-Associated Virus Carrying Small Interfering RNA Targeting TIMP-1 in Rat Liver Fibrosis. *The American Journal of Pathology* 182, 1607–1616.
- Crombez, L., Aldrian-Herrada, G., Konate, K., Nguyen, Q.N., McMaster, G.K., Bresseur, R., Heitz, F., and Divita, G. (2009). A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells. *Mol. Ther.* 17, 95–103.
- Cusi, K., Orsak, B., Bril, F., Lomonaco, R., Hecht, J., Ortiz-López, C., Tio, F.O., Hardies, J., Darland, C., Musi, N., et al. (2016). Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus A Randomized Trial. p.
- D'Ambrosio, D.N., Clugston, R.D., and Blaner, W.S. (2011a). Vitamin A Metabolism: An Update. *Nutrients* 3, 63–103.
- D'Ambrosio, D.N., Walewski, J.L., Clugston, R.D., Berk, P.D., Rippe, R.A., and Blaner, W.S. (2011b). Distinct Populations of Hepatic Stellate Cells in the Mouse Liver Have Different Capacities for Retinoid and Lipid Storage. *PLoS ONE* 6, e24993.
- D'Ambrosio, R., Aghemo, A., Rumi, M.G., Ronchi, G., Donato, M.F., Paradis, V., Colombo, M., and Bedossa, P. (2012). A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis. *Hepatology* 56, 532–543.
- Davis, M.E., Zuckerman, J.E., Choi, C.H.J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C.A., Yen, Y., Heidel, J.D., and Ribas, A. (2010). Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464, 1067–1070.
- Day, C.P., and James, O.F.W. (1998). Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology* 114, 842–845.
- De Bleser, P.J., Niki, T., Rogiers, V., and Geerts, A. (1997). Transforming growth factor- β gene expression in normal and fibrotic rat liver. *Journal of Hepatology* 26, 886–893.

- De Minicis, S., Seki, E., Uchinami, H., Kluwe, J., Zhang, Y., Brenner, D.A., and Schwabe, R.F. (2007). Gene Expression Profiles During Hepatic Stellate Cell Activation in Culture and In Vivo. *Gastroenterology* 132, 1937–1946.
- Dejneka, N.S., Wan, S., Bond, O.S., Kornbrust, D.J., and Reich, S.J. (2008). Ocular biodistribution of bevasiranib following a single intravitreal injection to rabbit eyes. *Mol. Vis.* 14, 997–1005.
- DeLeve, L.D., Wang, X., Hu, L., McCuskey, M.K., and McCuskey, R.S. (2004). Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 287, G757–G763.
- Demirjian, S., Ailawadi, G., Polinsky, M., Bitran, D., Silberman, S., Shernan, S.K., Burnier, M., Hamilton, M., Squiers, E., Erlich, S., et al. (2017). Safety and Tolerability Study of an Intravenously Administered Small Interfering Ribonucleic Acid (siRNA) Post On-Pump Cardiothoracic Surgery in Patients at Risk of Acute Kidney Injury. *Kidney Int Rep* 2, 836–843.
- Dixon, J.B., Bhathal, P.S., Hughes, N.R., and O'Brien, P.E. (2004). Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology* 39, 1647–1654.
- Docherty, J.F., and Burgess, E. (1922). THE ACTION OF CARBON TETRACHLORIDE ON THE LIVER. *BMJ* 2, 907–908.
- Dong, Y., Siegwart, D.J., and Anderson, D.G. (2019). Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 144, 133–147.
- Dongiovanni, P., Meroni, M., Baselli, G.A., Bassani, G.A., Rametta, R., Pietrelli, A., Maggioni, M., Facciotti, F., Trunzo, V., Badiali, S., et al. (2017). Insulin resistance promotes Lysyl Oxidase Like 2 induction and fibrosis accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* 131, 1301–1315.
- Dorsett, Y., and Tuschl, T. (2004). siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 3, 318–329.
- Dou, L., Shi, X., He, X., and Gao, Y. (2020). Macrophage Phenotype and Function in Liver Disorder. *Front Immunol* 10.
- Douglass, A., Wallace, K., Koruth, M., Barelle, C., Porter, A.J., and Wright, M.C. (2008a). Targeting liver myofibroblasts: a novel approach in anti-fibrogenic therapy. *Hepatology* 47, 405–415.
- Douglass, A., Wallace, K., Parr, R., Park, J., Durward, E., Broadbent, I., Barelle, C., Porter, A.J., and Wright, M.C. (2008b). Antibody-targeted myofibroblast apoptosis reduces fibrosis during sustained liver injury. *Journal of Hepatology* 49, 88–98.
- Dranoff, J.A., and Wells, R.G. (2010). Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology* 51, 1438–1444.
- Du, S.-L., Pan, H., Lu, W.-Y., Wang, J., Wu, J., and Wang, J.-Y. (2007). Cyclic Arg-Gly-Asp Peptide-Labeled Liposomes for Targeting Drug Therapy of Hepatic Fibrosis in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 322, 560–568.
- Duarte, S., Baber, J., Fujii, T., and Coito, A.J. (2015). Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol* 0, 147–156.

- Duong, H.T.T., Dong, Z., Su, L., Boyer, C., George, J., Davis, T.P., and Wang, J. (2015). The Use of Nanoparticles to Deliver Nitric Oxide to Hepatic Stellate Cells for Treating Liver Fibrosis and Portal Hypertension. *Small* 11, 2291–2304.
- Dyson, J., Jaques, B., Chattopadhyay, D., Lochan, R., Graham, J., Das, D., Aslam, T., Patanwala, I., Gaggar, S., Cole, M., et al. (2014). Hepatocellular cancer: the impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. *J. Hepatol.* 60, 110–117.
- Eguchi, A., Mollerat Du Jeu, X.D., Johnson, C.D., Nektaria, A., and Feldstein, A.E. (2016). Liver Bid-suppression for treatment of fibrosis associated with nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 64, 699–707.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498.
- Elsharkawy, A., Alem, S.A., Fouad, R., El Raziky, M., El Akel, W., Abdo, M., Tantawi, O., AbdAllah, M., Bourliere, M., and Esmat, G. (2017). Changes in liver stiffness measurements and fibrosis scores following sofosbuvir based treatment regimens without interferon. *J Gastroenterol Hepatol* 32, 1624–1630.
- Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z., and Sanyal, A.J. (2018). Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 67, 123–133.
- Fabregat, I., Moreno-Càceres, J., Sánchez, A., Dooley, S., Dewidar, B., Giannelli, G., ten Dijke, P., and the IT-LIVER Consortium (2016). TGF- β signalling and liver disease. *FEBS J* 283, 2219–2232.
- Faghihzadeh, F., Adibi, P., Rafiee, R., and Hekmatdoost, A. (2014). Resveratrol supplementation improves inflammatory biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition Research* 34, 837–843.
- Fang, L., Huang, C., Meng, X., Wu, B., Ma, T., Liu, X., Zhu, Q., Zhan, S., and Li, J. (2014). TGF- β 1-elevated TRPM7 channel regulates collagen expression in hepatic stellate cells via TGF- β 1/Smad pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology* 280, 335–344.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7413–7417.
- Felgner, P.L., Barenholz, Y., Behr, J.P., Cheng, S.H., Cullis, P., Huang, L., Jessee, J.A., Seymour, L., Szoka, F., Thierry, A.R., et al. (1997). Nomenclature for Synthetic Gene Delivery Systems. *Human Gene Therapy* 8, 511–512.
- Ferenc, M., Pedziwiatr-Werbicka, E., Nowak, K.E., Klajnert, B., Majoral, J.-P., and Bryszewska, M. (2013). Phosphorus Dendrimers as Carriers of siRNA—Characterisation of Dendriplexes. *Molecules* 18, 4451–4466.
- Fewell, G.D., and Schmitt, K. (2006). Vector-based RNAi approaches for stable, inducible and genome-wide screens. *Drug Discovery Today* 11, 975–982.
- Fiorucci, S., Antonelli, E., Rizzo, G., Renga, B., Mencarelli, A., Riccardi, L., Orlandi, S., Pellicciari, R., and Morelli, A. (2004). The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology* 127, 1497–1512.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.

Fonseca, N.A., Lopes, R.M., Cruz, A.F., Gregório, A.C., Valério-Fernandes, Â., Moura, V., Simões, S., and Moreira, J.N. (2018). Chapter 16 - Lipid-Based Nanosystems for the Delivery of siRNA: Challenges and Trends. In *Handbook of Nanomaterials for Cancer Theranostics*, J. Conde, ed. (Elsevier), pp. 495–515.

Forouzanfar, M.H., Afshin, A., Alexander, L.T., Anderson, H.R., Bhutta, Z.A., Biryukov, S., Brauer, M., Burnett, R., Cercy, K., Charlson, F.J., et al. (2016). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* 388, 1659–1724.

de Fougerolles, A.R. (2008). Delivery Vehicles for Small Interfering RNA *In Vivo*. *Human Gene Therapy* 19, 125–132.

de Fougerolles, A., Vornlocher, H.-P., Maraganore, J., and Lieberman, J. (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 443–453.

Fowell, A.J., Collins, J.E., Duncombe, D.R., Pickering, J.A., Rosenberg, W.M.C., and Benyon, R.C. (2011). Silencing tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) with short interfering RNA reveals a role for TIMP-1 in hepatic stellate cell proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 407, 277–282.

Frenette, C.T., Morelli, G., Shiffman, M.L., Frederick, R.T., Rubin, R.A., Fallon, M.B., Cheng, J.T., Cave, M., Khaderi, S.A., Massoud, O., et al. (2019). Emerican Improves Liver Function in Patients With Cirrhosis and High Model for End-Stage Liver Disease Scores Compared With Placebo. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 17, 774-783.e4.

Friedman, S.L. (1993). The Cellular Basis of Hepatic Fibrosis -- Mechanisms and Treatment Strategies | *NEJM*.

Friedman, S.L. (2003). Liver fibrosis – from bench to bedside. *Journal of Hepatology* 38, 38–53.

Friedman, S.L. (2004). Stellate cells: A moving target in hepatic fibrogenesis. *Hepatology* 40, 1041–1043.

Friedman, S.L. (2008a). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiological Reviews* 88, 125–172.

Friedman, S.L. (2008b). Hepatic fibrosis—Overview. *Toxicology* 254, 120–129.

Friedman, S.L. (2010). Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 7, 425–436.

Friedman, S.L. (2015). Hepatic Fibrosis: Emerging Therapies. *Dig Dis* 33, 504–507.

Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., and Sanyal, A.J. (2018a). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 24, 908–922.

Friedman, S.L., Ratziu, V., Harrison, S.A., Abdelmalek, M.F., Aithal, G.P., Caballeria, J., Francque, S., Farrell, G., Kowdley, K.V., Craxi, A., et al. (2018b). A randomized, placebo-

controlled trial of cenicriviroc for treatment of nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis. *Hepatology* 67, 1754–1767.

Fu, R., Wu, J., Ding, J., Sheng, J., Hong, L., Sun, Q., Fang, H., and Xiang, D. (2011). Targeting transforming growth factor β RII expression inhibits the activation of hepatic stellate cells and reduces collagen synthesis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 236, 291–297.

Gailhouse, L., Le Grand, Y., Odin, C., Guyader, D., Turlin, B., Ezan, F., Désille, Y., Guilbert, T., Bessard, A., Frémin, C., et al. (2010). Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy: a new tool in the assessment of liver fibrosis. *J. Hepatol.* 52, 398–406.

Gao, K., and Huang, L. (2013). Achieving efficient RNAi therapy: progress and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 3, 213–225.

Garcia-Bañuelos, J., Siller-Lopez, F., Miranda, A., Aguilar, L.K., Aguilar-Cordova, E., and Armendariz-Borunda, J. (2002). Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Therapy* 9, 127–134.

Garcia-Tsao, G., Fuchs, M., Shiffman, M., Borg, B.B., Pylsopoulos, N., Shetty, K., Gallegos-Orozco, J.F., Reddy, K.R., Feysa, E., Chan, J.L., et al. (2019). Emricasan (IDN-6556) Lowers Portal Pressure in Patients With Compensated Cirrhosis and Severe Portal Hypertension. *Hepatology* 69, 717–728.

Geerts, A. (2001). History, Heterogeneity, Developmental Biology, and Functions of Quiescent Hepatic Stellate Cells. *Semin Liver Dis* 21, 311–336.

Gelse, K., Pöschl, E., and Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 1531–1546.

Genfit, G. (2020). GENFIT annonce les résultats de l'analyse intermédiaire de l'étude de Phase 3 RESOLVE-IT évaluant elafibranor chez des adultes atteints de NASH avec fibrose.

Giannone, F.A., Baldassarre, M., Domenicali, M., Zaccherini, G., Trevisani, F., Bernardi, M., and Caraceni, P. (2012). Reversal of liver fibrosis by the antagonism of endocannabinoid CB1 receptor in a rat model of CCl(4)-induced advanced cirrhosis. *Lab. Invest.* 92, 384–395.

Gonzalez-Bulnes, A., Ovilo, C., Lopez-Bote, C.J., Astiz, S., Ayuso, M., Perez-Solana, M.L., Sanchez-Sanchez, R., and Torres-Rovira, L. (2012). Gender-specific early postnatal catch-up growth after intrauterine growth retardation by food restriction in swine with obesity/leptin resistance. *Reproduction* 144, 269–278.

Gracia-Sancho, J., Manicardi, N., Ortega-Ribera, M., Maeso-Díaz, R., Guixé-Muntet, S., Fernández-Iglesias, A., Hide, D., García-Calderó, H., Boyer-Díaz, Z., Contreras, P.C., et al. (2019). Emricasan Ameliorates Portal Hypertension and Liver Fibrosis in Cirrhotic Rats Through a Hepatocyte-Mediated Paracrine Mechanism. *Hepatol Commun* 3, 987–1000.

Greupink, R., Bakker, H.I., Bouma, W., Reker-Smit, C., Meijer, D.K.F., Beljaars, L., and Poelstra, K. (2006). The Antiproliferative Drug Doxorubicin Inhibits Liver Fibrosis in Bile Duct-Ligated Rats and Can Be Selectively Delivered to Hepatic Stellate Cells in Vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 317, 514–521.

Grimm, D., Streetz, K.L., Jopling, C.L., Storm, T.A., Pandey, K., Davis, C.R., Marion, P., Salazar, F., and Kay, M.A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441, 537–541.

- Gu, J., Al-Bayati, K., and Ho, E.A. (2017). Development of antibody-modified chitosan nanoparticles for the targeted delivery of siRNA across the blood-brain barrier as a strategy for inhibiting HIV replication in astrocytes. *Drug Deliv Transl Res* 7, 497–506.
- Guzman-Aranguez, A., Loma, P., and Pintor, J. (2013). Small-interfering RNAs (siRNAs) as a promising tool for ocular therapy. *Br J Pharmacol* 170, 730–747.
- Harada, S., Miyagi, K., Obata, T., Morimoto, Y., Nakamoto, K., Kim, K.I., Kim, S.K., Kim, S.R., and Tokuyama, S. (2017). Influence of hyperglycemia on liver inflammatory conditions in the early phase of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 69, 698–705.
- Harrison, S.A., Marri, S.R., Chalasani, N., Kohli, R., Aronstein, W., Thompson, G.A., Irish, W., Miles, M.V., Xanthakos, S.A., Lawitz, E., et al. (2016). Randomised clinical study: GR-MD-02, a galectin-3 inhibitor, vs. placebo in patients having non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 44, 1183–1198.
- Harrison, S.A., Abdelmalek, M.F., Caldwell, S., Shiffman, M.L., Diehl, A.M., Ghalib, R., Lawitz, E.J., Rockett, D.C., Schall, R.A., Jia, C., et al. (2018a). Simtuzumab Is Ineffective for Patients With Bridging Fibrosis or Compensated Cirrhosis Caused by Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 155, 1140–1153.
- Harrison, S.A., Rinella, M.E., Abdelmalek, M.F., Trotter, J.F., Paredes, A.H., Arnold, H.L., Kugelmas, M., Bashir, M.R., Jaros, M.J., Ling, L., et al. (2018b). NGM282 for treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet* 391, 1174–1185.
- Harrison, S.A., Dennis, A., Fiore, M.M., Kelly, M.D., Kelly, C.J., Paredes, A.H., Whitehead, J.M., Neubauer, S., Traber, P.G., and Banerjee, R. (2018c). Utility and variability of three non-invasive liver fibrosis imaging modalities to evaluate efficacy of GR-MD-02 in subjects with NASH and bridging fibrosis during a phase-2 randomized clinical trial. *PLoS One* 13.
- Harrison, S.A., Rossi, S.J., Paredes, A.H., Trotter, J.F., Bashir, M.R., Guy, C.D., Banerjee, R., Jaros, M.J., Owers, S., Baxter, B.A., et al. (2020a). NGM282 Improves Liver Fibrosis and Histology in 12 Weeks in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* *n/a*.
- Harrison, S.A., Goodman, Z., Jabbar, A., Vemulapalli, R., Younes, Z.H., Freilich, B., Sheikh, M.Y., Schattenberg, J.M., Kayali, Z., Zivony, A., et al. (2020b). A randomized, placebo-controlled trial of emricasan in patients with NASH and F1-F3 fibrosis. *Journal of Hepatology* 72, 816–827.
- Häussinger, D., and Kordes, C. (2019). Space of Disse: a stem cell niche in the liver. *Biological Chemistry* 401, 81–95.
- Hellems, K., Rombouts, K., Quartier, E., Dittie, A.S., Knorr, A., Michalik, L., Rogiers, V., Schuit, F., Wahli, W., and Geerts, A. (2003). PPAR β regulates vitamin A metabolism-related gene expression in hepatic stellate cells undergoing activation. *J. Lipid Res.* 44, 280–295.
- Hellems, K., Verbuyst, P., Quartier, E., Schuit, F., Rombouts, K., Chandraratna, R.A.S., Schuppan, D., and Geerts, A. (2004). Differential modulation of rat hepatic stellate phenotype by natural and synthetic retinoids. *Hepatology* 39, 97–108.
- Hernandez-Gea, V., and Friedman, S.L. (2011). Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6, 425–456.

- Herrmann, J., Gressner, A.M., and Weiskirchen, R. (2007). Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *J Cellular Mol Med* 11, 704–722.
- Ho, W., Zhang, X.-Q., and Xu, X. (2016). Biomaterials in siRNA Delivery: A Comprehensive Review. *Advanced Healthcare Materials* 5, 2715–2731.
- Holland, J.W., Cullis, P.R., and Madden, T.D. (1996). Poly(ethylene glycol)–Lipid Conjugates Promote Bilayer Formation in Mixtures of Non-Bilayer-Forming Lipids †. *Biochemistry* 35, 2610–2617.
- Horas H Nababan, S., Nishiumi, S., Kawano, Y., Kobayashi, T., Yoshida, M., and Azuma, T. (2017). Adrenic acid as an inflammation enhancer in non-alcoholic fatty liver disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 623–624, 64–75.
- Hosseini, E.S., Nikkhah, M., and Hosseinkhani, S. (2019). Cholesterol-rich lipid-mediated nanoparticles boost of transfection efficiency, utilized for gene editing by CRISPR-Cas9. *Int J Nanomedicine* 14, 4353–4366.
- Hu, B., Weng, Y., Xia, X.-H., Liang, X., and Huang, Y. (2019). Clinical advances of siRNA therapeutics. *The Journal of Gene Medicine* 21, e3097.
- Hu, Y.-B., Li, D.-G., and Lu, H.-M. (2007). Modified synthetic siRNA targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits hepatic fibrogenesis in rats. *J. Gene Med.* 9, 217–229.
- Huang, G., and Brigstock, D.R. (2012). Regulation of hepatic stellate cells by connective tissue growth factor. *Frontiers in Bioscience* 17, 2495–2507.
- Huang, Y., Deng, X., and Liang, J. (2017). Modulation of hepatic stellate cells and reversibility of hepatic fibrosis. *Experimental Cell Research* 352, 420–426.
- Hu-Lieskovan, S., Heidel, J.D., Bartlett, D.W., Davis, M.E., and Triche, T.J. (2005). Sequence-Specific Knockdown of EWS-FLI1 by Targeted, Nonviral Delivery of Small Interfering RNA Inhibits Tumor Growth in a Murine Model of Metastatic Ewing's Sarcoma. *Cancer Res* 65, 8984–8992.
- Ikawa-Yoshida, A., Matsuo, S., Kato, A., Ohmori, Y., Higashida, A., Kaneko, E., and Matsumoto, M. (2017). Hepatocellular carcinoma in a mouse model fed a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet. *Int. J. Exp. Path.* 98, 221–233.
- Ikenaga, N., Liu, S.B., Sverdlov, D.Y., Yoshida, S., Nasser, I., Ke, Q., Kang, P.M., and Popov, Y. (2015). A New Mdr2^{-/-} Mouse Model of Sclerosing Cholangitis with Rapid Fibrosis Progression, Early-Onset Portal Hypertension, and Liver Cancer. *The American Journal of Pathology* 185, 325–334.
- Ikenaga, N., Peng, Z.-W., Vaid, K.A., Liu, S.B., Yoshida, S., Sverdlov, D.Y., Mikels-Vigdal, A., Smith, V., Schuppan, D., and Popov, Y.V. (2017). Selective targeting of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) suppresses hepatic fibrosis progression and accelerates its reversal. *Gut* 66, 1697–1708.
- Imbert-Bismut, F., Ratziu, V., Pieroni, L., Charlotte, F., Benhamou, Y., and Poynard, T. (2001). Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *The Lancet* 357, 1069–1075.
- Iorns, E., Lord, C.J., Turner, N., and Ashworth, A. (2007). Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 556–568.

Iredale, J.P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29, 43–54.

Iredale, J.P. (2001). Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin. Liver Dis.* 21, 427–436.

Iredale, J.P., Thompson, A., and Henderson, N.C. (2013). Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1832, 876–883.

Ismail, M.H., and Pinzani, M. (2009). Reversal of Liver Fibrosis. *Saudi J Gastroenterol* 15, 72–79.

Issa, R., Zhou, X., Trim, N., Millward-Sadler, H., Krane, S., Benyon, C., and Iredale, J. (2003). Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl₄-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration. *FASEB J.* 17, 47–49.

Issa, R., Zhou, X., Constandinou, C.M., Fallowfield, J., Millward-Sadler, H., Gaca, M.D.A., Sands, E., Suliman, I., Trim, N., and Knorr, A. (2004). Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: Evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking☆. *Gastroenterology* 126, 1795–1808.

Itagaki, H., Shimizu, K., Morikawa, S., Ogawa, K., and Ezaki, T. (2013). Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice. *Int J Clin Exp Pathol* 6, 2683–2696.

Iwaisako, K., Jiang, C., Zhang, M., Cong, M., Moore-Morris, T.J., Park, T.J., Liu, X., Xu, J., Wang, P., Paik, Y.-H., et al. (2014). Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E3297-3305.

Jain, A., Barve, A., Zhao, Z., Fetse, J.P., Liu, H., Li, Y., and Cheng, K. (2019). Targeted Delivery of an siRNA/PNA Hybrid Nanocomplex Reverses Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis. *Advanced Therapeutics* 2, 1900046.

Johnson, K.J. (1994). *The retinoids: Biology, chemistry and medicine (second edition)* Edited by M B Sporn, A B Roberts and the late D S Goodman. pp 311. Raven Press, NY. 1993. \$250.00 ISBN 0-7817-0082-5. *Biochemical Education* 22, 56–56.

Jophlin, L.L., Koutalos, Y., Chen, C., Shah, V., and Rockey, D.C. (2018). Hepatic stellate cells retain retinoid-laden lipid droplets after cellular transdifferentiation into activated myofibroblasts. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 315, G713–G721.

Judge, A.D., Bola, G., Lee, A.C.H., and MacLachlan, I. (2006). Design of Noninflammatory Synthetic siRNA Mediating Potent Gene Silencing in Vivo. *Molecular Therapy* 13, 494–505.

Jung, Y.K., and Yim, H.J. (2017). Reversal of liver cirrhosis: current evidence and expectations. *Korean J Intern Med* 32, 213–228.

Kanasty, R., Dorkin, J.R., Vegas, A., and Anderson, D. (2013). Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature Materials* 12, 967–977.

Kane, M.A., Folias, A.E., and Napoli, J.L. (2008). HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues. *Analytical Biochemistry* 378, 71–79.

- Kaps, L., Nuhn, L., Aslam, M., Brose, A., Foerster, F., Rosigkeit, S., Renz, P., Heck, R., Kim, Y.O., Lieberwirth, I., et al. (2015). In Vivo Gene-Silencing in Fibrotic Liver by siRNA-Loaded Cationic Nanohydrogel Particles. *Adv. Healthcare Mater.* *4*, 2809–2815.
- Karsdal, M.A., Manon-Jensen, T., Genovese, F., Kristensen, J.H., Nielsen, M.J., Sand, J.M.B., Hansen, N.-U.B., Bay-Jensen, A.-C., Bager, C.L., Krag, A., et al. (2015). Novel insights into the function and dynamics of extracellular matrix in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *308*, G807–G830.
- Kataria, Y., Deaton, R.J., Enk, E., Jin, M., Petrauskaite, M., Dong, L., Goldenberg, J.R., Cotler, S.J., Jensen, D.M., van Breemen, R.B., et al. (2016). Retinoid and carotenoid status in serum and liver among patients at high-risk for liver cancer. *BMC Gastroenterol* *16*.
- Kessoku, T., Imajo, K., Honda, Y., Kato, T., Ogawa, Y., Tomeno, W., Kato, S., Mawatari, H., Fujita, K., Yoneda, M., et al. (2016). Resveratrol ameliorates fibrosis and inflammation in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Scientific Reports* *6*, 22251.
- Khaja, F., Jayawardena, D., Kuzmis, A., and Önyüksel, H. (2016). Targeted Sterically Stabilized Phospholipid siRNA Nanomedicine for Hepatic and Renal Fibrosis. *Nanomaterials (Basel)* *6*.
- Khoury, M., Louis-Plence, P., Escriou, V., Noel, D., Largeau, C., Cantos, C., Scherman, D., Jorgensen, C., and Apparailly, F. (2006). Efficient new cationic liposome formulation for systemic delivery of small interfering RNA silencing tumor necrosis factor α in experimental arthritis. *Arthritis & Rheumatism* *54*, 1867–1877.
- Khoury, M., Escriou, V., Courties, G., Galy, A., Yao, R., Largeau, C., Scherman, D., Jorgensen, C., and Apparailly, F. (2008). Efficient suppression of murine arthritis by combined anticytokine small interfering RNA lipoplexes. *Arthritis & Rheumatism* *58*, 2356–2367.
- Kichler, A., Mason, A.J., Marquette, A., and Bechinger, B. (2013). Histidine-rich cationic amphipathic peptides for plasmid DNA and siRNA delivery. *Methods Mol. Biol.* *948*, 85–103.
- Kikuchi, S., Griffin, C.T., Wang, S.-S., and Bissell, D.M. (2005). Role of CD44 in Epithelial Wound Repair MIGRATION OF RAT HEPATIC STELLATE CELLS UTILIZES HYALURONIC ACID AND CD44v6. *J. Biol. Chem.* *280*, 15398–15404.
- Kim, D.H., and Rossi, J.J. (2008). RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques* *44*, 613–616.
- Kim, K.S., Hur, W., Park, S.-J., Hong, S.W., Choi, J.E., Goh, E.J., Yoon, S.K., and Hahn, S.K. (2010). Bioimaging for Targeted Delivery of Hyaluronic Acid Derivatives to the Livers in Cirrhotic Mice Using Quantum Dots. *ACS Nano* *4*, 3005–3014.
- Kim, S.-J., Ise, H., Kim, E., Goto, M., Akaike, T., and Chung, B.H. (2013). Imaging and therapy of liver fibrosis using bioreducible polyethylenimine/siRNA complexes conjugated with N-acetylglucosamine as a targeting moiety. *Biomaterials* *34*, 6504–6514.
- Kimura, K., Ikoma, A., Shibakawa, M., Shimoda, S., Harada, K., Saio, M., Imamura, J., Osawa, Y., Kimura, M., Nishikawa, K., et al. (2017). Safety, Tolerability, and Preliminary Efficacy of the Anti-Fibrotic Small Molecule PRI-724, a CBP/ β -Catenin Inhibitor, in Patients with Hepatitis C Virus-related Cirrhosis: A Single-Center, Open-Label, Dose Escalation Phase 1 Trial. *EBioMedicine* *23*, 79–87.

- Kisseleva, T., Cong, M., Paik, Y., Scholten, D., Jiang, C., Benner, C., Iwaisako, K., Moore-Morris, T., Scott, B., Tsukamoto, H., et al. (2012). Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 9448–9453.
- Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Natta, M.V., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.-C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., et al. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41, 1313–1321.
- Kluwe, J., Wongsiriroj, N., Troeger, J.S., Gwak, G.-Y., Dapito, D.H., Pradere, J.-P., Jiang, H., Siddiqi, M., Piantedosi, R., O’Byrne, S.M., et al. (2011). Absence of hepatic stellate cell retinoid lipid droplets does not enhance hepatic fibrosis but decreases hepatic carcinogenesis. *Gut* 60, 1260–1268.
- Knop, V., Hoppe, D., Welzel, T., Vermehren, J., Herrmann, E., Vermehren, A., Friedrich-Rust, M., Sarrazin, C., Zeuzem, S., and Welker, M.-W. (2016). Regression of fibrosis and portal hypertension in HCV-associated cirrhosis and sustained virologic response after interferon-free antiviral therapy. *J Viral Hepat* 23, 994–1002.
- Kobayashi, N., Iijima, H., Tada, T., Kumada, T., Yoshida, M., Aoki, T., Nishimura, T., Nakano, C., Takata, R., Yoh, K., et al. (2018). Changes in liver stiffness and steatosis among patients with hepatitis C virus infection who received direct-acting antiviral therapy and achieved sustained virological response. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 30, 546–551.
- Kocabayoglu, P., Lade, A., Lee, Y.A., Dragomir, A.-C., Sun, X., Fiel, M.I., Thung, S., Aloman, C., Soriano, P., Hoshida, Y., et al. (2015). β -PDGF Receptor Expressed by Hepatic Stellate Cells Regulates Fibrosis in Murine Liver Injury, but Not Carcinogenesis. *J Hepatol* 63, 141–147.
- Kohli, R., Kirby, M., Xanthakos, S.A., Softic, S., Feldstein, A.E., Saxena, V., Tang, P.H., Miles, L., Miles, M.V., Balistreri, W.F., et al. (2010). High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 52, 934–944.
- Kong, W.H., Park, K., Lee, M.-Y., Lee, H., Sung, D.K., and Hahn, S.K. (2013). Cationic solid lipid nanoparticles derived from apolipoprotein-free LDLs for target specific systemic treatment of liver fibrosis. *Biomaterials* 34, 542–551.
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R.A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., and Lowe, S.W. (2008). Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell* 134, 657–667.
- Kruger, A.J., Fuchs, B.C., Masia, R., Holmes, J.A., Salloum, S., Sojoodi, M., Ferreira, D.S., Rutledge, S.M., Caravan, P., Alatrakchi, N., et al. (2018). Prolonged cenicriviroc therapy reduces hepatic fibrosis despite steatohepatitis in a diet-induced mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology Communications* 2, 529–545.
- Kulkarni, J.A., Cullis, P.R., and van der Meel, R. (2018). Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. *Nucleic Acid Therapeutics* 28, 146–157.
- Kumar, M., and Sarin, S.K. (2007). Is cirrhosis of the liver reversible? *Indian J Pediatr* 74, 393–399.
- Kurreck, J. (2009). RNA Interference: From Basic Research to Therapeutic Applications. *Angewandte Chemie International Edition* 48, 1378–1398.

- Kuttenkeuler, D., and Boutros, M. (2004). Genome-wide RNAi as a route to gene function in *Drosophila*. *Brief Funct Genomic Proteomic* 3, 168–176.
- Kweon, Y.-O., Goodman, Z.D., Dienstag, J.L., Schiff, E.R., Brown, N.A., Burkhardt, E., Schoonhoven, R., Brenner, D.A., and Fried, M.W. (2001). Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 35, 749–755.
- Lackner, C., and Tiniakos, D. (2019). Fibrosis and alcohol-related liver disease. *Journal of Hepatology* 70, 294–304.
- Landen, C.N., Chavez-Reyes, A., Bucana, C., Schmandt, R., Deavers, M.T., Lopez-Berestein, G., and Sood, A.K. (2005). Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res.* 65, 6910–6918.
- Langlet-Bertin, B., Leborgne, C., Scherman, D., Bechinger, B., Mason, A.J., and Kichler, A. (2010). Design and evaluation of histidine-rich amphipathic peptides for siRNA delivery. *Pharm. Res.* 27, 1426–1436.
- Lanthier, N. (2018). Non-alcoholic steatohepatitis in 2018. 6.
- Lassailly, G., Caiazzo, R., Buob, D., Pigeyre, M., Verkindt, H., Labreuche, J., Raverdy, V., Leteurre, E., Dharancy, S., Louvet, A., et al. (2015). Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology* 149, 379–388.
- Lawitz, E.J., Coste, A., Poordad, F., Alkhouri, N., Loo, N., McColgan, B.J., Tarrant, J.M., Nguyen, T., Han, L., Chung, C., et al. (2018). Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitor GS-0976 for 12 Weeks Reduces Hepatic De Novo Lipogenesis and Steatosis in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 16, 1983-1991.e3.
- Lecluyse, E., Witek, R., Andersen, M., and Powers, M. (2012). Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. *Critical Reviews in Toxicology* 42, 501–548.
- Lee, U.E., and Friedman, S.L. (2011). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 25, 195–206.
- Lee, H., Jeong, H., Park, S., Yoo, W., Choi, S., Choi, K., Lee, M.-G., Lee, M., Cha, D., Kim, Y.-S., et al. (2015a). Fusion protein of retinol-binding protein and albumin domain III reduces liver fibrosis. *EMBO Mol Med* 7, 819–830.
- Lee, J.-S., Chang, E.H., Koo, O.J., Jwa, D.H., Mo, W.M., Kwak, G., Moon, H.W., Park, H.T., Hong, Y.B., and Choi, B.-O. (2017). Pmp22 mutant allele-specific siRNA alleviates demyelinating neuropathic phenotype in vivo. *Neurobiology of Disease* 100, 99–107.
- Lee, S.H., Kang, Y.Y., Jang, H.-E., and Mok, H. (2016). Current preclinical small interfering RNA (siRNA)-based conjugate systems for RNA therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 104, 78–92.
- Lee, Y., Doumouras, A.G., Yu, J., Brar, K., Banfield, L., Gmora, S., Anvari, M., and Hong, D. (2019). Complete Resolution of Nonalcoholic Fatty Liver Disease After Bariatric Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 17, 1040-1060.e11.
- Lee, Y.A., Wallace, M.C., and Friedman, S.L. (2015b). Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* 64, 830–841.

- Lefebvre, E., Moyle, G., Reshef, R., Richman, L.P., Thompson, M., Hong, F., Chou, H., Hashiguchi, T., Plato, C., Poulin, D., et al. (2016). Antifibrotic Effects of the Dual CCR2/CCR5 Antagonist Cenicriviroc in Animal Models of Liver and Kidney Fibrosis. *PLoS One* 11.
- Lemoine, S., and Friedman, S.L. (2019). New and emerging anti-fibrotic therapeutics entering or already in clinical trials in chronic liver diseases. *Current Opinion in Pharmacology* 49, 60–70.
- Lemoine, S., Cadoret, A., Rautou, P.-E., Mourabit, H.E., Ratziu, V., Corpechot, C., Rey, C., Bosselut, N., Barbu, V., Wendum, D., et al. (2015). Portal myofibroblasts promote vascular remodeling underlying cirrhosis formation through the release of microparticles. *Hepatology* 61, 1041–1055.
- Lens, S., Alvarado-Tapias, E., Mariño, Z., Londoño, M.-C., Llop, E., Martinez, J., Fortea, J.I., Ibañez, L., Ariza, X., Baiges, A., et al. (2017). Effects of All-Oral Anti-Viral Therapy on HVPG and Systemic Hemodynamics in Patients With Hepatitis C Virus-Associated Cirrhosis. *Gastroenterology* 153, 1273-1283.e1.
- Leo, M.A., Rosman, A.S., and Lieber, C.S. (1993). Differential depletion of carotenoids and tocopherol in liver disease. *Hepatology* 17, 977–986.
- Leung, R.K.M., and Whittaker, P.A. (2005). RNA interference: From gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther* 107, 222–239.
- Levanova, A., and Poranen, M.M. (2018). RNA Interference as a Prospective Tool for the Control of Human Viral Infections. *Front Microbiol* 9.
- Li, D., He, L., Guo, H., Chen, H., and Shan, H. (2015a). Targeting activated hepatic stellate cells (aHSCs) for liver fibrosis imaging. *EJNMMI Res* 5.
- Li, F., Li, Q., Wang, J., Zhan, C., Xie, C., and Lu, W. (2012). Effects of interferon-gamma liposomes targeted to platelet-derived growth factor receptor–beta on hepatic fibrosis in rats. *Journal of Controlled Release* 159, 261–270.
- Li, S., Ghoshal, S., Sojoodi, M., Arora, G., Masia, R., Erstad, D.J., Lanuti, M., Hoshida, Y., Baumert, T.F., Tanabe, K.K., et al. (2019). Pioglitazone Reduces Hepatocellular Carcinoma Development in Two Rodent Models of Cirrhosis. *J. Gastrointest. Surg.* 23, 101–111.
- Li, W., Zhou, C., Fu, Y., Chen, T., Liu, X., Zhang, Z., and Gong, T. (2020). Targeted delivery of hyaluronic acid nanomicelles to hepatic stellate cells in hepatic fibrosis rats. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 10, 693–710.
- Li, X., Chen, Y., Ye, W., Tao, X., Zhu, J., Wu, S., and Lou, L. (2015b). Blockade of CCN4 attenuates CCl4-induced liver fibrosis. *Archives of Medical Science : AMS* 11, 647.
- Li, X., Wu, X.-Q., Xu, T., Li, X.-F., Yang, Y., Li, W.-X., Huang, C., Meng, X.-M., and Li, J. (2016). Role of histone deacetylases(HDACs) in progression and reversal of liver fibrosis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 306, 58–68.
- LI, Y., LIU, F., DING, F., CHEN, P., and TANG, M. (2015). Inhibition of liver fibrosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver matrix metalloproteinase-2 siRNA in vitro. *Mol Med Rep* 12, 3453–3461.
- Lim, B.J., Lee, W.-K., Lee, H.W., Lee, K.S., Kim, J.K., Chang, H.Y., and Lee, J.I. (2018). Selective deletion of hepatocyte platelet-derived growth factor receptor α and development of liver fibrosis in mice. *Cell Communication and Signaling* 16, 93.

- Lindquist, J.N., Stekanovic, B., and Brenkr, D.A. (2000). Regulation of collagen al(I) expression in hepatic stellate cells. 5.
- Lipscomb, E.A., Dugan, A.S., Rabinovitz, I., and Mercurio, A.M. (2003). Use of RNA interference to inhibit integrin (alpha6beta4)-mediated invasion and migration of breast carcinoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 20, 569–576.
- Liu, H., Chen, Z., Jin, W., Barve, A., Wan, Y.-J.Y., and Cheng, K. (2017). Silencing of α -complex protein-2 reverses alcohol- and cytokine-induced fibrogenesis in hepatic stellate cells. *Liver Research* 1, 70–79.
- Liu, S.B., Ikenaga, N., Peng, Z.-W., Sverdlov, D.Y., Greenstein, A., Smith, V., Schuppan, D., and Popov, Y. (2016). Lysyl oxidase activity contributes to collagen stabilization during liver fibrosis progression and limits spontaneous fibrosis reversal in mice. *FASEB J.* 30, 1599–1609.
- Liu, X., Xu, J., Brenner, D.A., and Kisseleva, T. (2013). Reversibility of Liver Fibrosis and Inactivation of Fibrogenic Myofibroblasts. *Current Pathobiology Reports* 1, 209–214.
- Liu, Y., Chen, H., Wang, J., Zhou, W., Sun, R., and Xia, M. (2015). Association of serum retinoic acid with hepatic steatosis and liver injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 102, 130–137.
- Loomba, R., Lawitz, E., Ghalib, R., Elkhashab, M., Caldwell, S., Abdelmalek, M., Kowdley, K., Xu, R., Chen, G., Djedjos, C.S., et al. (2017). SAT-489 - Longitudinal changes in liver stiffness by magnetic resonance elastography (MRE), liver fibrosis, and serum markers of fibrosis in a multi-center clinical trial in nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Journal of Hepatology* 66, S671.
- Loomba, R., Kayali, Z., Nouredin, M., Ruane, P., Lawitz, E.J., Bennett, M., Wang, L., Harting, E., Tarrant, J.M., McColgan, B.J., et al. (2018a). GS-0976 Reduces Hepatic Steatosis and Fibrosis Markers in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 155, 1463-1473.e6.
- Loomba, R., Lawitz, E., Mantry, P.S., Jayakumar, S., Caldwell, S.H., Arnold, H., Diehl, A.M., Djedjos, C.S., Han, L., Myers, R.P., et al. (2018b). The ASK1 inhibitor selonsertib in patients with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, phase 2 trial. *Hepatology* 67, 549–559.
- Lurie, Y., Webb, M., Cytter-Kuint, R., Shteingart, S., and Lederkremer, G.Z. (2015). Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol* 21, 11567–11583.
- Lustig, R.H., Schmidt, L.A., and Brindis, C.D. (2012). The toxic truth about sugar. *Nature* 482, 27–29.
- Maden, C.H., Fairman, D., Chalker, M., Costa, M.J., Fahy, W.A., Garman, N., Lukey, P.T., Mant, T., Parry, S., Simpson, J.K., et al. (2018). Safety, tolerability and pharmacokinetics of GSK3008348, a novel integrin $\alpha\beta 6$ inhibitor, in healthy participants. *Eur J Clin Pharmacol* 74, 701–709.
- Maepa, M.B., Ely, A., and Arbutnot, P. (2018). How successful has targeted RNA interference for hepatic fibrosis been? *Expert Opinion on Biological Therapy* 18, 381–388.
- Maiers, J.L., Kostallari, E., Mushref, M., de Assuncao, T.M., Li, H., Huebert, R.C., Cao, S., Malhi, H., and Shah, V.H. (2017). The UPR mediates fibrogenesis and collagen I secretion through regulating TANGO1. *Hepatology* 65, 983–998.

- Mak, K.M., Chen, L.L., and Lee, T.-F. (2013). Codistribution of Collagen Type IV and Laminin in Liver Fibrosis of Elderly Cadavers: Immunohistochemical Marker of Perisinusoidal Basement Membrane Formation. *The Anatomical Record* 296, 953–964.
- Makino, Y., Hikita, H., Kodama, T., Shigekawa, M., Yamada, R., Sakamori, R., Eguchi, H., Morii, E., Yokoi, H., Mukoyama, M., et al. (2018). CTGF Mediates Tumor–Stroma Interactions between Hepatoma Cells and Hepatic Stellate Cells to Accelerate HCC Progression. *Cancer Res* 78, 4902–4914.
- Mallat, A., and Lotersztajn, S. (2013). Reversion of hepatic stellate cell to a quiescent phenotype: From myth to reality? *Journal of Hepatology* 59, 383–386.
- Mann, J., and Mann, D.A. (2009). Transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 497–512.
- Marcellin, P., Gane, E., Buti, M., Afdhal, N., Sievert, W., Jacobson, I.M., Washington, M.K., Germanidis, G., Flaherty, J.F., Schall, R.A., et al. (2013). Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *The Lancet* 381, 468–475.
- Marimani, M.D., Ely, A., Buff, M.C.R., Bernhardt, S., Engels, J.W., Scherman, D., Escriou, V., and Arbuthnot, P. (2015). Inhibition of replication of hepatitis B virus in transgenic mice following administration of hepatotropic lipoplexes containing guanidinopropyl-modified siRNAs. *Journal of Controlled Release* 209, 198–206.
- Marin, V., Rosso, N., Dal Ben, M., Raseni, A., Boschelle, M., Degrassi, C., Nemeckova, I., Nachtigal, P., Avellini, C., Tiribelli, C., et al. (2016). An Animal Model for the Juvenile Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS ONE* 11, e0158817.
- Martinez, L.A., Naguibneva, I., Lehrmann, H., Vervisch, A., Tchénio, T., Lozano, G., and Harel-Bellan, A. (2002). Synthetic small inhibiting RNAs: Efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14849–14854.
- Matsumoto, M., Hada, N., Sakamaki, Y., Uno, A., Shiga, T., Tanaka, C., Ito, T., Katsume, A., and Sudoh, M. (2013). An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int. J. Exp. Path.* 94, 93–103.
- McCaffrey, A.P., Nakai, H., Pandey, K., Huang, Z., Salazar, F.H., Xu, H., Wieland, S.F., Marion, P.L., and Kay, M.A. (2003). Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nature Biotechnology* 21, 639–644.
- McCarthy, H.O., Wang, Y., Mangipudi, S.S., and Hatefi, A. (2010). Advances with the use of bio-inspired vectors towards creation of artificial viruses. *Expert Opin Drug Deliv* 7, 497–512.
- McNamara, J.O., Andrechek, E.R., Wang, Y., Viles, K.D., Rempel, R.E., Gilboa, E., Sullenger, B.A., and Giangrande, P.H. (2006). Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat. Biotechnol.* 24, 1005–1015.
- Mederacke, I., Dapito, D.H., Affò, S., Uchinami, H., and Schwabe, R.F. (2015). High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nat Protoc* 10, 305–315.
- Meissner, E.G., McLaughlin, M., Matthews, L., Gharib, A.M., Wood, B.J., Levy, E., Sinkus, R., Virtaneva, K., Sturdevant, D., Martens, C., et al. (2016). Simtuzumab treatment of advanced liver fibrosis in HIV and HCV-infected adults: results of a 6-month open-label safety trial. *Liver International* 36, 1783–1792.

- Mignet, N., Seguin, J., Ramos Romano, M., Brullé, L., Touil, Y.S., Scherman, D., Bessodes, M., and Chabot, G.G. (2012). Development of a liposomal formulation of the natural flavonoid fisetin. *Int J Pharm* 423, 69–76.
- Mishra, S., Heidel, J.D., Webster, P., and Davis, M.E. (2006). Imidazole groups on a linear, cyclodextrin-containing polycation produce enhanced gene delivery via multiple processes. *Journal of Controlled Release* 116, 179–191.
- Miyazaki, H., Takitani, K., Koh, M., Inoue, A., Kishi, K., and Tamai, H. (2014). Retinol Status and Expression of Retinol-Related Proteins in Methionine-Choline Deficient Rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 60, 78–85.
- Molokanova, O., Schönig, K., Weng, S.-Y., Wang, X., Bros, M., Diken, M., Ohngemach, S., Karsdal, M., Strand, D., Nikolaev, A., et al. (2018). Inducible knockdown of procollagen I protects mice from liver fibrosis and leads to dysregulated matrix genes and attenuated inflammation. *Matrix Biology* 66, 34–49.
- Moore, C.B., Guthrie, E.H., Huang, M.T.-H., and Taxman, D.J. (2010). Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown. *Methods Mol Biol* 629, 141–158.
- Moriwaki, H., Blaner, W.S., Piantedosi, R., and Goodman, D.S. (1988). Effects of dietary retinoid and triglyceride on the lipid composition of rat liver stellate cells and stellate cell lipid droplets. *J. Lipid Res.* 29, 1523–1534.
- Mossanen, J.C., Krenkel, O., Ergen, C., Govaere, O., Liepelt, A., Puengel, T., Heymann, F., Kalthoff, S., Lefebvre, E., Eulberg, D., et al. (2016). Chemokine (C-C motif) receptor 2–positive monocytes aggravate the early phase of acetaminophen-induced acute liver injury. *Hepatology* 64, 1667–1682.
- Mounajjed, T., Graham, R.P., Sanderson, S.O., and Smyrk, T.C. (2014). Clinical associations of hepatic stellate cell (HSC) hyperplasia. *Virchows Arch* 465, 57–65.
- Mouw, J.K., Ou, G., and Weaver, V.M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 771–785.
- Muir, A.J., Levy, C., Janssen, H.L.A., Montano-Loza, A.J., Shiffman, M.L., Caldwell, S., Luketic, V., Ding, D., Jia, C., McColgan, B.J., et al. (2019). Simtuzumab for Primary Sclerosing Cholangitis: Phase 2 Study Results With Insights on the Natural History of the Disease. *Hepatology* 69, 684–698.
- Musso, G., Gambino, R., Cassader, M., and Pagano, G. (2010). A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 52, 79–104.
- Nagata, K. (1998). Expression and Function of Heat Shock Protein 47: A CotLagen-Specific Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum. 8.
- Natarajan, S.K., Thomas, S., Ramachandran, A., Pulimood, A.B., and Balasubramanian, K.A. (2005). Retinoid metabolism during development of liver cirrhosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 443, 93–100.
- Neuschwander-Tetri, B.A., Loomba, R., Sanyal, A.J., Lavine, J.E., Van Natta, M.L., Abdelmalek, M.F., Chalasani, N., Dasarathy, S., Diehl, A.M., Hameed, B., et al. (2015). Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet* 385, 956–965.

- Newsome, P., Francque, S., Harrison, S., Ratziu, V., Gaal, L.V., Calanna, S., Hansen, M., Linder, M., and Sanyal, A. (2019). Effect of semaglutide on liver enzymes and markers of inflammation in subjects with type 2 diabetes and/or obesity. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 50, 193–203.
- Newsome, P.N., Beldon, I., Moussa, Y., Delahooke, T.E., Pouloupoulos, G., Hayes, P.C., and Plevris, J.N. (2000). Low serum retinol levels are associated with hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14, 1295–1301.
- Niki, T., De Bleser, P.J., Xu, G., Van der Berg, K., Wisse, E., and Geerts, A. (1996). Comparison of glial fibrillary acidic protein and desmin staining in normal and CCl₄-induced fibrotic rat livers. *Hepatology* 23, 1538–1545.
- Nishikawa, K., Iwaya, K., Kinoshita, M., Fujiwara, Y., Akao, M., Sonoda, M., Thiruppathi, S., Suzuki, T., Hiroi, S., Seki, S., et al. (2015). Resveratrol increases CD68+ Kupffer cells colocalized with adipose differentiation-related protein and ameliorates high-fat-diet-induced fatty liver in mice. *Molecular Nutrition & Food Research* 59, 1155–1170.
- Noga, A.A., and Vance, D.E. (2003). Insights into the requirement of phosphatidylcholine synthesis for liver function in mice. *J. Lipid Res.* 44, 1998–2005.
- Nolleaux, M.-C., Guiot, Y., Horsmans, Y., Leclercq, I., Rahier, J., Geubel, A.P., and Sempoux, C. (2006). Hypervitaminosis A-induced liver fibrosis: stellate cell activation and daily dose consumption. *Liver International* 26, 182–186.
- Nosova, A.S., Koloskova, O.O., Nikonova, A.A., Simonova, V.A., Smirnov, V.V., Kudlay, D., and Khaitov, M.R. (2019). Diversity of PEGylation methods of liposomes and their influence on RNA delivery. *Med. Chem. Commun.* 10, 369–377.
- Novina, C.D., and Sharp, P.A. (2004). The RNAi revolution. *Nature* 430, 161–164.
- Ogura, M. (2018). PCSK9 inhibition in the management of familial hypercholesterolemia. *J Cardiol* 71, 1–7.
- Oh, Y., Park, O., Swierczewska, M., Hamilton, J.P., Park, J.-S., Kim, T.H., Lim, S.-M., Eom, H., Jo, D.G., Lee, C.-E., et al. (2016). Systemic PEGylated TRAIL treatment ameliorates liver cirrhosis in rats by eliminating activated hepatic stellate cells. *Hepatology* 64, 209–223.
- Okumura, A., Pitha, P.M., and Harty, R.N. (2008). ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. *PNAS* 105, 3974–3979.
- Oliveira, A.C.N., Fernandes, J., Gonçalves, A., Gomes, A.C., and Oliveira, M.E.C.D.R. (2019). Lipid-based Nanocarriers for siRNA Delivery: Challenges, Strategies and the Lessons Learned from the DODAX: MO Liposomal System. *Current Drug Targets*.
- O'Mahony, F., Wroblewski, K., O'Byrne, S.M., Jiang, H., Clerkin, K., Benhammou, J., Blaner, W.S., and Beaven, S.W. (2015). Liver X receptors balance lipid stores in hepatic stellate cells through Rab18, a retinoid responsive lipid droplet protein: *Liver Biology/Pathobiology*. *Hepatology* 62, 615–626.
- Osawa, Y., Oboki, K., Imamura, J., Kojika, E., Hayashi, Y., Hishima, T., Saibara, T., Shibasaki, F., Kohara, M., and Kimura, K. (2015). Inhibition of Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP)-response Element-binding Protein (CREB)-binding Protein (CBP)/β-Catenin Reduces Liver Fibrosis in Mice. *EBioMedicine* 2, 1751–1758.

- Osawa, Y., Kojika, E., Hayashi, Y., Kimura, M., Nishikawa, K., Yoshio, S., Doi, H., Kanto, T., and Kimura, K. (2018). Tumor necrosis factor- α -mediated hepatocyte apoptosis stimulates fibrosis in the steatotic liver in mice. *Hepatology Communications* 2, 407–420.
- Osta, W.A., Chen, Y., Mikhitarian, K., Mitas, M., Salem, M., Hannun, Y.A., Cole, D.J., and Gillanders, W.E. (2004). EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res.* 64, 5818–5824.
- Pan, M., Ni, J., He, H., Gao, S., and Duan, X. (2015). New paradigms on siRNA local application. *BMB Rep* 48, 147–152.
- Pan, T.-L., Wang, P.-W., Hung, C.-F., Aljuffali, I.A., Dai, Y.-S., and Fang, J.-Y. (2016). The impact of retinol loading and surface charge on the hepatic delivery of lipid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 141, 584–594.
- Panebianco, C., Oben, J.A., Vinciguerra, M., and Paziienza, V. (2017). Senescence in hepatic stellate cells as a mechanism of liver fibrosis reversal: a putative synergy between retinoic acid and PPAR- γ signalings. *Clin Exp Med* 17, 269–280.
- Park, K., Hong, S.W., Hur, W., Lee, M.-Y., Yang, J.-A., Kim, S.W., Yoon, S.K., and Hahn, S.K. (2011). Target specific systemic delivery of TGF- β siRNA/(PEI-SS)-g-HA complex for the treatment of liver cirrhosis. *Biomaterials* 32, 4951–4958.
- Park, S., Choi, S., Lee, M.-G., Lim, C., and Oh, J. (2012). Retinol Binding Protein-Albumin Domain III Fusion Protein Deactivates Hepatic Stellate Cells. *Mol Cells* 34, 517–522.
- Parsons, C.J., Bradford, B.U., Pan, C.Q., Cheung, E., Schauer, M., Knorr, A., Krebs, B., Kraft, S., Zahn, S., Brocks, B., et al. (2004). Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. *Hepatology* 40, 1106–1115.
- Patsenker, E., and Stickel, F. (2011). Role of integrins in fibrosing liver diseases. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 301, G425–G434.
- Patsenker, E., Popov, Y., Stickel, F., Jonczyk, A., Goodman, S.L., and Schuppan, D. (2008). Inhibition of Integrin α v β 6 on Cholangiocytes Blocks Tgfbeta Activation and Retards Biliary Fibrosis Progression. *Gastroenterology* 135, 660–670.
- Pena, A.-M., Fabre, A., Débarre, D., Marchal-Somme, J., Crestani, B., Martin, J.-L., Beaurepaire, E., and Schanne-Klein, M.-C. (2007). Three-dimensional investigation and scoring of extracellular matrix remodeling during lung fibrosis using multiphoton microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 70, 162–170.
- Perepelyuk, M., Terajima, M., Wang, A.Y., Georges, P.C., Janmey, P.A., Yamauchi, M., and Wells, R.G. (2013). Hepatic stellate cells and portal fibroblasts are the major cellular sources of collagens and lysyl oxidases in normal liver and early after injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 304, G605–G614.
- Pockros, P., Crissien-Martinez, A.M., Frenette, C., Skillin, C., Bao, F., Du, E., Pan, J.J., and Waalen, J. (2017). Degree of liver fibrosis regression predicted by transient elastography after cure of chronic hepatitis C with direct acting antivirals is overestimated but confirmed by liver biopsy.
- Pockros, P.J., Fuchs, M., Freilich, B., Schiff, E., Kohli, A., Lawitz, E.J., Hellstern, P.A., Owens-Grillo, J., Biene, C.V., Shringarpure, R., et al. (2019). CONTROL: A randomized phase 2 study of obeticholic acid and atorvastatin on lipoproteins in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Liver International* 39, 2082–2093.

- Poillil Surendran, S., George Thomas, R., Moon, M.J., and Jeong, Y.Y. (2017). Nanoparticles for the treatment of liver fibrosis. *Int J Nanomedicine* 12, 6997–7006.
- Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., and Rautou, P.-E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology* 66, 212–227.
- Popov, Y., Sverdlov, D.Y., Bhaskar, K.R., Sharma, A.K., Millonig, G., Patsenker, E., Krahenbuhl, S., Krahenbuhl, L., and Schuppan, D. (2010). Macrophage-mediated phagocytosis of apoptotic cholangiocytes contributes to reversal of experimental biliary fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 298, G323–G334.
- Poynard, T., Lebray, P., Ingiliz, P., Varaut, A., Varsat, B., Ngo, Y., Norha, P., Munteanu, M., Drane, F., Messous, D., et al. (2010). Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest). *BMC Gastroenterol* 10, 40.
- Pozzi, D., Marchini, C., Cardarelli, F., Amenitsch, H., Garulli, C., Bifone, A., and Caracciolo, G. (2012). Transfection efficiency boost of cholesterol-containing lipoplexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2335–2343.
- Promrat, K., Kleiner, D.E., Niemeier, H.M., Jackvony, E., Kearns, M., Wands, J.R., Fava, J., and Wing, R.R. (2010). Randomized Controlled Trial Testing the Effects of Weight Loss on Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Hepatology* 51, 121–129.
- Puengel, T., Krenkel, O., Mossanen, J., Longerich, T., Lefebvre, E., Trautwein, C., and Tacke, F. (2016). GS10 - The Dual Ccr2/Ccr5 Antagonist Cenicriviroc Ameliorates Steatohepatitis and Fibrosis in Vivo by Inhibiting the Infiltration of Inflammatory Monocytes into Injured Liver. *Journal of Hepatology* 64, S160.
- Pun, S.H., and Davis, M.E. (2002). Development of a Nonviral Gene Delivery Vehicle for Systemic Application. *Bioconjugate Chem.* 13, 630–639.
- Qiao, J.-B., Fan, Q.-Q., Xing, L., Cui, P.-F., He, Y.-J., Zhu, J.-C., Wang, L., Pang, T., Oh, Y.-K., Zhang, C., et al. (2018). Vitamin A-decorated biocompatible micelles for chemogene therapy of liver fibrosis. *Journal of Controlled Release* 283, 113–125.
- Qureshi, A., Tantray, V.G., Kirmani, A.R., and Ahangar, A.G. (2018). A review on current status of antiviral siRNA. *Rev Med Virol* 28.
- Rachmawati, H., Reker-Smit, C., Lub-de Hooge, M.N., van Loenen-Weemaes, A., Poelstra, K., and Beljaars, L. (2007). Chemical modification of interleukin-10 with mannose 6-phosphate groups yields a liver-selective cytokine. *Drug Metab. Dispos.* 35, 814–821.
- Radaeva, S., Sun, R., Jaruga, B., Nguyen, V.T., Tian, Z., and Gao, B. (2006). Natural Killer Cells Ameliorate Liver Fibrosis by Killing Activated Stellate Cells in NKG2D-Dependent and Tumor Necrosis Factor–Related Apoptosis-Inducing Ligand–Dependent Manners. *Gastroenterology* 130, 435–452.
- Rädler, J.O., Koltover, I., Salditt, T., and Safinya, C.R. (1997). Structure of DNA-Cationic Liposome Complexes: DNA Intercalation in Multilamellar Membranes in Distinct Interhelical Packing Regimes. *Science* 275, 810–814.
- Raghow, R. (1994). The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *The FASEB Journal* 8, 823–831.

- Ramachandran, P., Pellicoro, A., Vernon, M.A., Boulter, L., Aucott, R.L., Ali, A., Hartland, S.N., Snowden, V.K., Cappon, A., Gordon-Walker, T.T., et al. (2012). Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E3186–E3195.
- Ramadori, P., Weiskirchen, R., Trebicka, J., and Streetz, K. (2015). Mouse models of metabolic liver injury. *Lab Anim* 49, 47–58.
- Rao, D.D., Vorhies, J.S., Senzer, N., and Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 746–759.
- Ratziu, V., Harrison, S.A., Francque, S., Bedossa, P., Lehert, P., Serfaty, L., Romero-Gomez, M., Boursier, J., Abdelmalek, M., Caldwell, S., et al. (2016). Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* 150, 1147-1159.e5.
- Ratziu, V., de Guevara, L., Safadi, R., Poordad, F., Fuster, F., Flores-Figueroa, J., Harrison, S.A., Fargion, S., Bashat, D.B., Lackner, C., et al. (2018). One-year results of the Global Phase 2b randomized placebo- controlled ARREST Trial of Aramchol, a Stearoyl CoA Desaturase modulator in NASH patients. 19.
- Ray, K.K., Landmesser, U., Leiter, L.A., Kallend, D., Dufour, R., Karakas, M., Hall, T., Troquay, R.P.T., Turner, T., Visseren, F.L.J., et al. (2017). Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *N. Engl. J. Med.* 376, 1430–1440.
- Refaat, O., Jiaqi, Y., Haoyuan, L., Neal, M.D., and Yuewen, G. (2016). Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology. 172 172.
- Reich, S.J., Fosnot, J., Kuroki, A., Tang, W., Yang, X., Maguire, A.M., Bennett, J., and Tolentino, M.J. (2003). Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol. Vis.* 9, 210–216.
- Remaut, K., Lucas, B., Braeckmans, K., Demeester, J., and De Smedt, S.C. (2007). Pegylation of liposomes favours the endosomal degradation of the delivered phosphodiester oligonucleotides. *Journal of Controlled Release* 117, 256–266.
- Rezaee, M., Oskuee, R.K., Nassirli, H., and Malaekheh-Nikouei, B. (2016). Progress in the development of lipopolyplexes as efficient non-viral gene delivery systems. *Journal of Controlled Release* 236, 1–14.
- Rhinn, H., Largeau, C., Bigey, P., Kuen, R.L., Richard, M., Scherman, D., and Escriou, V. (2009). How to make siRNA lipoplexes efficient? Add a DNA cargo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790, 219–230.
- Rinella, M.E., Trotter, J.F., Abdelmalek, M.F., Paredes, A.H., Connelly, M.A., Jaros, M.J., Ling, L., Rossi, S.J., DePaoli, A.M., and Harrison, S.A. (2019). Rosuvastatin improves the FGF19 analogue NGM282-associated lipid changes in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology* 70, 735–744.
- Roberts, T.C., Ezzat, K., EL Andaloussi, S., and Weinberg, M.S. (2016). Synthetic SiRNA Delivery: Progress and Prospects. In *SiRNA Delivery Methods: Methods and Protocols*, K. Shum, and J. Rossi, eds. (New York, NY: Springer), pp. 291–310.
- Roderfeld, M. (2018). Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis. *Matrix Biology* 68–69, 452–462.

- Roehlen, N., Crouchet, E., and Baumert, T.F. (2020). Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells* 9, 875.
- Rombouts, K. (2015). Chapter 2 - Hepatic Stellate Cell Culture Models. In *Stellate Cells in Health and Disease*, C.R. Gandhi, and M. Pinzani, eds. (Boston: Academic Press), pp. 15–27.
- Rondinone, C.M. (2006). Minireview: Ribonucleic Acid Interference for the Identification of New Targets for the Treatment of Metabolic Diseases. *Endocrinology* 147, 2650–2656.
- Rousseau, J., Escriou, V., Lamoureux, F., Brion, R., Chesneau, J., Battaglia, S., Amiaud, J., Scherman, D., Heymann, D., Rédini, F., et al. (2011). Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models. *J. Bone Miner. Res.* 26, 2452–2462.
- Roychowdhury, S., Chiang, D.J., Mandal, P., McMullen, M.R., Liu, X., Cohen, J.I., Pollard, J., Feldstein, A.E., and Nagy, L.E. (2012). Inhibition of apoptosis protects mice from ethanol-mediated acceleration of early markers of CCl₄-induced fibrosis but not steatosis or inflammation. *Alcohol Clin Exp Res* 36, 1139–1147.
- Saeed, A., Dullaart, R.P.F., Schreuder, T.C.M.A., Blokzijl, H., and Faber, K.N. (2018). Disturbed Vitamin A Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Nutrients* 10, 29.
- Sahai, A., Malladi, P., Pan, X., Paul, R., Melin-Aldana, H., Green, R.M., and Whittington, P.F. (2004). Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G1035-1043.
- Samarakoon, R., Overstreet, J.M., and Higgins, P.J. (2013). TGF- β signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities. *Cell. Signal.* 25, 264–268.
- Sandrin, L., Catheline, S., Tanter, M., Hennequin, X., and Fink, M. (1999). Time-Resolved Pulsed Elastography with Ultrafast Ultrasonic Imaging: Ultrasonic Imaging.
- Santhekadur, P.K., Kumar, D.P., and Sanyal, A.J. (2018). PRECLINICAL MODELS OF NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. *J Hepatol* 68, 230–237.
- Sanyal, A.J. (2010). ACP Journal Club: vitamin E, but not pioglitazone, improved nonalcoholic steatohepatitis in nondiabetic patients. *Ann. Intern. Med.* 153, JC3-12.
- Sanyal, A., Lopez, P., Lawitz, E., Kim, W., Huang, J.-F., Andreone, P., Goh, G.B.B., Chen, Y.-C., Ratziu, V., Kim, Y.J., et al. (2019). SAT-357-Tropifexor, a farnesoid X receptor agonist for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: Interim results based on baseline body mass index from first two parts of Phase 2b study FLIGHT-FXR. *Journal of Hepatology* 70, e796–e797.
- Sato, M., Suzuki, S., and Senoo, H. (2003). Hepatic Stellate Cells: Unique Characteristics in Cell Biology and Phenotype. *Cell Structure and Function* 28, 105–112.
- Sato, Y., Murase, K., Kato, J., Kobune, M., Sato, T., Kawano, Y., Takimoto, R., Takada, K., Miyanishi, K., Matsunaga, T., et al. (2008a). Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat Biotechnol* 26, 431–442.
- Sato, Y., Murase, K., Kato, J., Kobune, M., Sato, T., Kawano, Y., Takimoto, R., Takada, K., Miyanishi, K., Matsunaga, T., et al. (2008b). Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-

coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nature Biotechnology* 26, 431–442.

Satoh, T., Ichida, T., Matsuda, Y., Sugiyama, M., Yonekura, K., Ishikawa, T., and Asakura, H. (2000). Interaction between hyaluronan and CD44 in the development of dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 402–411.

Savage, D.B., and Semple, R.K. (2010). Recent insights into fatty liver, metabolic dyslipidaemia and their links to insulin resistance: *Current Opinion in Lipidology* 21, 329–336.

Saw, P.E., and Song, E.-W. (2020). siRNA therapeutics: a clinical reality. *Sci. China Life Sci.* 63, 485–500.

Scaglione, S., Kliethermes, S., Cao, G., Shoham, D., Durazo, R., Luke, A., and Volk, M. (2015). The Epidemiology of Cirrhosis in the United States: A Population-based Study. *Journal of Clinical Gastroenterology* 49, 690–696.

Scherman, D., Rousseau, A., Bigey, P., and Escriou, V. (2017). Genetic pharmacology: progresses in siRNA delivery and therapeutic applications. *Gene Therapy* 24, 151–156.

Schlegel, A., Largeau, C., Bigey, P., Bessodes, M., Lebozec, K., Scherman, D., and Escriou, V. (2011). Anionic polymers for decreased toxicity and enhanced in vivo delivery of siRNA complexed with cationic liposomes. *Journal of Controlled Release* 152, 393–401.

Schlegel, A., Bigey, P., and Escriou, V. (2013a). Cationic lipid-based nanoparticles for siRNA delivery. In *Advances in Genetics Research*, pp. 97–114.

Schlegel, A., Bigey, P., Dhotel, H., Scherman, D., and Escriou, V. (2013b). Reduced in vitro and in vivo toxicity of siRNA-lipoplexes with addition of polyglutamate. *Journal of Controlled Release* 165, 1–8.

Schluep, T., Lickliter, J., Hamilton, J., Lewis, D.L., Lai, C.-L., Lau, J.Y., Locarnini, S.A., Gish, R.G., and Given, B.D. (2017). Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of ARC-520 Injection, an RNA Interference-Based Therapeutic for the Treatment of Chronic Hepatitis B Virus Infection, in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev* 6, 350–362.

Schroeder, A., Levins, C.G., Cortez, C., Langer, R., and Anderson, D.G. (2010). Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. *J Intern Med* 267, 9–21.

Schuppan, D. (2015). Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 39, S51–S59.

Schuppan, D., and Kim, Y.O. (2013). Evolving therapies for liver fibrosis. *J Clin Invest* 123, 1887–1901.

Schuppan, D., Ashfaq-Khan, M., Yang, A.T., and Kim, Y.O. (2018). Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies. *Matrix Biology* 68–69, 435–451.

Scott, L.J. (2020). Givosiran: First Approval. *Drugs* 80, 335–339.

Seko, Y., Nishikawa, T., Umemura, A., Yamaguchi, K., Moriguchi, M., Yasui, K., Kimura, M., Iijima, H., Hashimoto, T., Sumida, Y., et al. (2018). Efficacy and safety of canagliflozin in type 2 diabetes mellitus patients with biopsy-proven nonalcoholic steatohepatitis classified as stage 1–3 fibrosis. *Diabetes Metab Syndr Obes* 11, 835–843.

- Senel, B., and Buyukkoroglu, G. (2019). Applications of Lipidic and Polymeric Nanoparticles for siRNA Delivery. *Antisense Therapy*.
- Senoo, H., Imai, K., Matano, Y., and Sato, M. (1998). Molecular mechanisms in the reversible regulation of morphology, proliferation and collagen metabolism in hepatic stellate cells by the three-dimensional structure of the extracellular matrix. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 13, S19–S32.
- Senoo, H., Kojima, N., and Sato, M. (2007). Vitamin A-Storing Cells (Stellate Cells). In *Vitamins & Hormones*, (Academic Press), pp. 131–159.
- Setiawan, V.W., Stram, D.O., Porcel, J., Lu, S.C., Le Marchand, L., and Nouredin, M. (2016). Prevalence of chronic liver disease and cirrhosis by underlying cause in understudied ethnic groups: the Multiethnic Cohort. *Hepatology* 64, 1969–1977.
- Setten, R.L., Rossi, J.J., and Han, S. (2019). The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 18, 421–446.
- Shen, H. (2003). Effect of transforming growth factor beta and bone morphogenetic proteins on rat hepatic stellate cell proliferation and trans-differentiation. *World Journal of Gastroenterology* 9, 784.
- Shi, F., Wasungu, L., Nomden, A., Stuart, M.C.A., Polushkin, E., Engberts, J.B.F.N., and Hoekstra, D. (2002). Interference of poly(ethylene glycol)-lipid analogues with cationic-lipid-mediated delivery of oligonucleotides; role of lipid exchangeability and non-lamellar transitions. *Biochem J* 366, 333–341.
- Shiffman, M., Freilich, B., Vuppalanchi, R., Watt, K., Chan, J.L., Spada, A., Hagerty, D.T., and Schiff, E. (2019). Randomised clinical trial: emricasan versus placebo significantly decreases ALT and caspase 3/7 activation in subjects with non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 49, 64–73.
- Shim, M.S., and Kwon, Y.J. (2010). Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. *The FEBS Journal* 277, 4814–4827.
- Shi-Wen, X., Leask, A., and Abraham, D. (2008). Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 19, 133–144.
- Shukla, R.S., Qin, B., Wan, Y.-J.Y., and Cheng, K. (2011). PCBP2 siRNA Reverses the Alcohol-induced Pro-fibrogenic Effects in Hepatic Stellate Cells. *Pharm Res* 28, 3058–3068.
- Simoes, S., Moreira, J.N., Fonseca, C., Düzgüneş, N., and Pedroso de Lima, M.C. (2004). On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 947–965.
- Sixfold Bioscience (2020). *siRNA Therapies: The Need For Better Delivery Systems*.
- Smith, B.W., and Adams, L.A. (2011). Non-alcoholic fatty liver disease. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 48, 97–113.
- Song, L.Y., Ahkong, Q.F., Rong, Q., Wang, Z., Ansell, S., Hope, M.J., and Mui, B. (2002). Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1558, 1–13.

- Sørensen, D.R., Leirdal, M., and Sioud, M. (2003). Gene Silencing by Systemic Delivery of Synthetic siRNAs in Adult Mice. *Journal of Molecular Biology* 327, 761–766.
- Sriram, S., Robinson, P., Pi, L., Lewin, A.S., and Schultz, G. (2013). Triple Combination of siRNAs Targeting TGF β 1, TGF β 2, and CTGF Enhances Reduction of Collagen I and Smooth Muscle Actin in Corneal Fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 8214–8223.
- Stanaway, J.D., Afshin, A., Gakidou, E., Lim, S.S., Abate, D., Abate, K.H., Abbafati, C., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., et al. (2018). Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* 392, 1923–1994.
- Strupler, M., Pena, A.-M., Hernest, M., Tharaux, P.-L., Martin, J.-L., Beaurepaire, E., and Schanne-Klein, M.-C. (2007). Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Opt. Express, OE* 15, 4054–4065.
- Sun, M., and Kisseleva, T. (2015). Reversibility of Liver Fibrosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 39, S60–S63.
- Sun, W., Chang, S., Tai, D.C.S., Tan, N., Xiao, G., Tang, H., and Yu, H. (2008). Nonlinear optical microscopy: use of second harmonic generation and two-photon microscopy for automated quantitative liver fibrosis studies. *J Biomed Opt* 13, 064010.
- Tag, C.G., Sauer-Lehnen, S., Weiskirchen, S., Borkham-Kamphorst, E., Tolba, R.H., Tacke, F., and Weiskirchen, R. (2015). Bile Duct Ligation in Mice: Induction of Inflammatory Liver Injury and Fibrosis by Obstructive Cholestasis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e52438.
- Tai, D.C.S., Tan, N., Xu, S., Kang, C.H., Chia, S.M., Cheng, C.L., Wee, A., Wei, C.L., Raja, A.M., Xiao, G., et al. (2009). Fibro-C-Index: comprehensive, morphology-based quantification of liver fibrosis using second harmonic generation and two-photon microscopy. *J Biomed Opt* 14, 044013.
- Takahashi, Y. (2012). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *WJG* 18, 2300.
- Tanwar, S., Rhodes, F., Srivastava, A., Trembling, P.M., and Rosenberg, W.M. (2020). Inflammation and fibrosis in chronic liver diseases including non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. *World J Gastroenterol* 26, 109–133.
- Tatiparti, K., Sau, S., Kashaw, S.K., and Iyer, A.K. (2017). siRNA Delivery Strategies: A Comprehensive Review of Recent Developments. *Nanomaterials (Basel)* 7.
- Thapaliya, S., Wree, A., Povero, D., Inzaugarat, M.E., Berk, M., Dixon, L., Papouchado, B.G., and Feldstein, A.E. (2014). Caspase 3 inactivation protects against hepatic cell death and ameliorates fibrogenesis in a diet-induced NASH model. *Dig. Dis. Sci.* 59, 1197–1206.
- Thèse de Anne Schlegel, A. (2012). Développement d'une formulation systémique d'acides nucléiques pour le traitement du cancer.
- Thomas, R.G., Moon, M.J., Kim, J.H., Lee, J.H., and Jeong, Y.Y. (2015). Effectiveness of Losartan-Loaded Hyaluronic Acid (HA) Micelles for the Reduction of Advanced Hepatic Fibrosis in C3H/HeN Mice Model. *PLoS One* 10.

- Tilg, H., and Moschen, A.R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52, 1836–1846.
- Tokunaga, Y., Osawa, Y., Ohtsuki, T., Hayashi, Y., Yamaji, K., Yamane, D., Hara, M., Munekata, K., Tsukiyama-Kohara, K., Hishima, T., et al. (2017). Selective inhibitor of Wnt/ β -catenin/CBP signaling ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis in mouse model. *Scientific Reports* 7, 325.
- Toriyabe, N., Sakurai, Y., Kato, A., Yamamoto, S., Tange, K., Nakai, Y., Akita, H., and Harahsima, H. (2017). The Delivery of Small Interfering RNA to Hepatic Stellate Cells Using a Lipid Nanoparticle Composed of a Vitamin A-Scaffold Lipid-Like Material. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 106, 2046–2052.
- Torok, N.J., Dranoff, J.A., Schuppan, D., and Friedman, S.L. (2015). Strategies and endpoints of antifibrotic drug trials: Summary and recommendations from the AASLD Emerging Trends Conference, Chicago, June 2014. *Hepatology* 62, 627–634.
- Traber, P.G., and Zomer, E. (2013). Therapy of Experimental NASH and Fibrosis with Galectin Inhibitors. *PLoS One* 8.
- Traber, P.G., Chou, H., Zomer, E., Hong, F., Klyosov, A., Fiel, M.-I., and Friedman, S.L. (2013). Regression of Fibrosis and Reversal of Cirrhosis in Rats by Galectin Inhibitors in Thioacetamide-Induced Liver Disease. *PLoS ONE* 8, e75361.
- Trabut, J.-B., Thépot, V., Nalpas, B., Lavielle, B., Coscinea, S., Corouge, M., Vallet-Pichard, A., Fontaine, H., Mallet, V., Sogni, P., et al. (2012). Rapid Decline of Liver Stiffness Following Alcohol Withdrawal in Heavy Drinkers. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 36, 1407–1411.
- Traussnigg, S., Schattenberg, J.M., Demir, M., Wiegand, J., Geier, A., Teuber, G., Hofmann, W.P., Kremer, A.E., Spreda, F., Kluwe, J., et al. (2019). Norursodeoxycholic acid versus placebo in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 dose-finding trial. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 4, 781–793.
- Trautwein, C., Friedman, S.L., Schuppan, D., and Pinzani, M. (2015). Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *Journal of Hepatology* 62, S15–S24.
- Troeger, J.S., Mederacke, I., Gwak, G., Dapito, D.H., Mu, X., Hsu, C.C., Pradere, J., Friedman, R.A., and Schwabe, R.F. (2012). Deactivation of Hepatic Stellate Cells During Liver Fibrosis Resolution in Mice. *Gastroenterology* 143, 1073-1083.e22.
- Tsuchida, T., and Friedman, S.L. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 14, 397–411.
- Tsukada, S., Westwick, J.K., Ikejima, K., Sato, N., and Rippe, R.A. (2005). SMAD and p38 MAPK Signaling Pathways Independently Regulate α 1(I) Collagen Gene Expression in Unstimulated and Transforming Growth Factor- β -stimulated Hepatic Stellate Cells. *J. Biol. Chem.* 280, 10055–10064.
- Uchio, K., Tuchweber, B., Manabe, N., Gabbiani, G., Rosenbaum, J., and Desmoulière, A. (2002). Cellular Retinol-Binding Protein-1 Expression and Modulation during In Vivo and In Vitro Myofibroblastic Differentiation of Rat Hepatic Stellate Cells and Portal Fibroblasts. *Laboratory Investigation* 82, 619–628.

- Urashima, S., Tsutsumi, M., Ozaki, K., Tsuchishima, M., Shimanaka, K., Ueshima, Y., and Takase, S. (2000). Immunohistochemical study of hyaluronate receptor (CD44) in alcoholic liver disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 24, 34S-38S.
- Van de Bovenkamp, M., Groothuis, G.M.M., Meijer, D.K.F., and Olinga, P. (2007). Liver fibrosis in vitro: Cell culture models and precision-cut liver slices. *Toxicology in Vitro* 21, 545–557.
- Varin, F., and Huet, P.M. (1985). Hepatic microcirculation in the perfused cirrhotic rat liver. *J Clin Invest* 76, 1904–1912.
- Venne, P., Yargeau, V., and Segura, P.A. (2016). Quantification of ecdysteroids and retinoic acids in whole daphnids by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1438, 57–64.
- Verrill, C., Markham, H., Templeton, A., Carr, N.J., and Sheron, N. (2009). Alcohol-related cirrhosis—early abstinence is a key factor in prognosis, even in the most severe cases. *Addiction* 104, 768–774.
- Vilar-Gomez, E., Martinez-Perez, Y., Calzadilla-Bertot, L., Torres-Gonzalez, A., Gra-Oramas, B., Gonzalez-Fabian, L., Friedman, S.L., Diago, M., and Romero-Gomez, M. (2015). Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 149, 367-378.e5.
- Wang, X., Sommerfeld, M.R., Jahn-Hofmann, K., Cai, B., Filliol, A., Remotti, H.E., Schwabe, R.F., Kannt, A., and Tabas, I. (2019). A Therapeutic Silencing RNA Targeting Hepatocyte TAZ Prevents and Reverses Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. *Hepatol Commun* 3, 1221–1234.
- Warren, A., Cogger, V.C., Fraser, R., DeLeve, L.D., McCuskey, R.S., and Le Couteur, D.G. (2011). The Effects of Old Age on Hepatic Stellate Cells. *Curr Gerontol Geriatr Res* 2011.
- Weiskirchen, R., and Tacke, F. (2014). Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg Nutr* 3, 344–363.
- Weiskirchen, S., Tag, C.G., Sauer-Lehnen, S., Tacke, F., and Weiskirchen, R. (2017). Isolation and Culture of Primary Murine Hepatic Stellate Cells. In *Fibrosis: Methods and Protocols*, L. Rittié, ed. (New York, NY: Springer), pp. 165–191.
- Weng, Y., Xiao, H., Zhang, J., Liang, X.-J., and Huang, Y. (2019). RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. *Biotechnology Advances* 37, 801–825.
- Wight, T.N., and Potter-Perigo, S. (2011). The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301, G950–G955.
- Wilson, D.S., Dalmaso, G., Wang, L., Sitaraman, S.V., Merlin, D., and Murthy, N. (2010). Orally delivered thioketal nanoparticles loaded with TNF- α -siRNA target inflammation and inhibit gene expression in the intestines. *Nature Materials* 9, 923–928.
- Witek, R.P., Stone, W.C., Karaca, F.G., Syn, W.-K., Pereira, T.A., Agboola, K.M., Omenetti, A., Jung, Y., Teaberry, V., Choi, S.S., et al. (2009). Pan-caspase inhibitor VX-166 reduces fibrosis in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 50, 1421–1430.
- Wittrup, A., and Lieberman, J. (2015). Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet* 16, 543–552.

- Wooddell, C.I., Yuen, M.-F., Chan, H.L.-Y., Gish, R.G., Locarnini, S.A., Chavez, D., Ferrari, C., Given, B.D., Hamilton, J., Kanner, S.B., et al. (2017). RNAi-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis B virus DNA is a source of HBsAg. *Sci Transl Med* 9.
- Xiao, J., Ho, C.T., Liong, E.C., Nanji, A.A., Leung, T.M., Lau, T.Y.H., Fung, M.L., and Tipoe, G.L. (2014). Epigallocatechin gallate attenuates fibrosis, oxidative stress, and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease rat model through TGF/SMAD, PI3 K/Akt/FoxO1, and NF-kappa B pathways. *Eur J Nutr* 53, 187–199.
- Xu, L. (2005). Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 54, 142–151.
- Xu, C., and Wang, J. (2015). Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 10, 1–12.
- Xu, F., Liu, C., Zhou, D., and Zhang, L. (2016). TGF- β /SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. *J Histochem Cytochem* 64, 157–167.
- Yadav, D., Hertan, H.I., Schweitzer, P., Norkus, E.P., and Pitchumoni, C.S. (2002). Serum and liver micronutrient antioxidants and serum oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Am. J. Gastroenterol.* 97, 2634–2639.
- Yamamoto, H., Yakushijin, K., Kusuhara, S., Escaño, M.F.T., Nagai, A., and Negi, A. (2003). A novel RDH5 gene mutation in a patient with fundus albipunctatus presenting with macular atrophy and fading white dots. *American Journal of Ophthalmology* 136, 572–574.
- Yamamoto, S., Oshima, Y., Saitou, T., Watanabe, T., Miyake, T., Yoshida, O., Tokumoto, Y., Abe, M., Matsuura, B., Hiasa, Y., et al. (2016). Quantitative imaging of fibrotic and morphological changes in liver of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mice by second harmonic generation (SHG) and auto-fluorescence (AF) imaging using two-photon excitation microscopy (TPEM). *Biochemistry and Biophysics Reports* 8, 277–283.
- Yang, J., Hou, Y., Ji, G., Song, Z., Liu, Y., Dai, G., Zhang, Y., and Chen, J. (2014a). Targeted delivery of the RGD-labeled biodegradable polymersomes loaded with the hydrophilic drug oxymatrine on cultured hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 52, 180–190.
- Yang, J.-A., Kong, W.H., Sung, D.K., Kim, H., Kim, T.H., Lee, K.C., and Hahn, S.K. (2015). Hyaluronic acid-tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand conjugate for targeted treatment of liver fibrosis. *Acta Biomater* 12, 174–182.
- Yang, L., Chan, C.-C., Kwon, O.-S., Liu, S., McGhee, J., Stimpson, S.A., Chen, L.Z., Harrington, W.W., Symonds, W.T., and Rockey, D.C. (2006). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in liver fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 291, G902–G911.
- Yang, L., Roh, Y.S., Song, J., Zhang, B., Liu, C., Loomba, R., and Seki, E. (2014b). Transforming growth factor beta signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice. *Hepatology* 59, 483–495.
- 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.

- Yao, Y., Xu, X.-H., and Jin, L. (2019). Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol* 10.
- Ye, Z., Cheng, K., Guntaka, R.V., and Mahato, R.I. (2006). Receptor-mediated Hepatic Uptake of M6P-BSA-conjugated Triplex Forming Oligonucleotides in Rats. *Bioconjug Chem* 17, 823–830.
- 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.
- Ying, H.-Z., Chen, Q., Zhang, W.-Y., Zhang, H.-H., Ma, Y., Zhang, S.-Z., Fang, J., and Yu, C.-H. (2017). PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports* 16, 7879–7889.
- Yokoi, Y., Namihisa, T., Kuroda, H., Komatsu, I., Miyazaki, A., Watanabe, S., and Usui, K. (1984). Immunocytochemical Detection of Desmin in Fat-Storing Cells (Ito Cells). *Hepatology* 4, 709–714.
- York, S.J., Arneson, L.S., Gregory, W.T., Dahms, N.M., and Kornfeld, S. (1999). The Rate of Internalization of the Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptor Is Enhanced by Multivalent Ligand Binding. *J. Biol. Chem.* 274, 1164–1171.
- Younossi, Z.M., Stepanova, M., Afendy, M., Fang, Y., Younossi, Y., Mir, H., and Srishord, M. (2011). Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 524-530.e1; quiz e60.
- Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., and Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64, 73–84.
- Younossi, Z.M., Ratziu, V., Loomba, R., Rinella, M., Anstee, Q.M., Goodman, Z., Bedossa, P., Geier, A., Beckebaum, S., Newsome, P.N., et al. (2019). Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 394, 2184–2196.
- Yuhua, Z., Wanhua, R., Chenggang, S., Jun, S., Yanjun, W., and Chunqing, Z. (2008). Disruption of connective tissue growth factor by short hairpin RNA inhibits collagen synthesis and extracellular matrix secretion in hepatic stellate cells: Disruption of connective tissue growth factor by short hairpin RNA. *Liver International* 28, 632–639.
- Zender, L., Hütker, S., Liedtke, C., Tillmann, H.L., Zender, S., Mundt, B., Waltemathe, M., Gösling, T., Flemming, P., Malek, N.P., et al. (2003). Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7797–7802.
- Zeng, X.-Y., Zhang, Y.-Q., He, X.-M., Wan, L.-Y., Wang, H., Ni, Y.-R., Wang, J., Wu, J.-F., and Liu, C.-B. (2016). Suppression of hepatic stellate cell activation through downregulation of gremlin1 expression by the miR-23b/27b cluster. *Oncotarget* 7, 86198–86210.
- Zhang, J., He, C., Tang, C., and Yin, C. (2013). Ternary Polymeric Nanoparticles for Oral siRNA Delivery. *Pharm Res* 30, 1228–1239.
- Zhang, Z., Wang, C., Zha, Y., Hu, W., Gao, Z., Zang, Y., Chen, J., Zhang, J., and Dong, L. (2015). Corona-Directed Nucleic Acid Delivery into Hepatic Stellate Cells for Liver Fibrosis Therapy. *ACS Nano* 9, 2405–2419.

- Zhao, Z., Li, Y., Jain, A., Chen, Z., Liu, H., Jin, W., and Cheng, K. (2018). Development of a Peptide-Modified siRNA Nanocomplex for Hepatic Stellate Cells. *Nanomedicine* 14, 51–61.
- Zhao, Z., Lin, C.-Y., and Cheng, K. (2019). siRNA- and miRNA-based therapeutics for liver fibrosis. *Translational Research* 214, 17–29.
- Zhou, L.-Y., Qin, Z., Zhu, Y.-H., He, Z.-Y., and Xu, T. (2019). Current RNA-based Therapeutics in Clinical Trials. *Curr Gene Ther* 19, 172–196.
- Zhu, L., and Mahato, R.I. (2010). Targeted Delivery of siRNA to Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells by Bioconjugation. *Bioconjug Chem* 21, 2119–2127.
- Zhu, C., Coombe, D.R., Zheng, M.H., Yeoh, G.C.T., and Li, L. (2013). Liver progenitor cell interactions with the extracellular matrix. *J Tissue Eng Regen Med* 7, 757–766.
- Zhu, Y., Miao, Z., Gong, L., and Chen, W. (2015). Transplantation of mesenchymal stem cells expressing TIMP-1-shRNA improves hepatic fibrosis in CCl₄-treated rats. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 8912–8920.
- Zoubek, M.E., Trautwein, C., and Strnad, P. (2017). Reversal of liver fibrosis: From fiction to reality. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 31, 129–141.
- Zuber, J., Shi, J., Wang, E., Rappaport, A.R., Herrmann, H., Sison, E.A., Magoon, D., Qi, J., Blatt, K., Wunderlich, M., et al. (2011). RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* 478, 524–528.

Annexe

Article : Hepatic stellate cell hypertrophy is associated with metabolic liver fibrosis

Céline Hoffmann, Nour El Houda Djerir, Anne Danckaert, Julien Fernandes, Pascal Roux, Christine Charrueau, Anne-Marie Lachagès, Frédéric Charlotte, Isabelle Brocheriou, Karine Clément, Judith Aron-Wisnewsky, Fabienne Foufelle, Vlad Ratziu, Bernard Hainque, Dominique Bonnefont-Rousselot, Pascal Bigey & Virginie Escriou.

Sci Rep **10**, 3850 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60615-0>

OPEN

Hepatic stellate cell hypertrophy is associated with metabolic liver fibrosis

Céline Hoffmann^{1,9*}, Nour El Houda Djerir^{1,9}, Anne Danckaert², Julien Fernandes², Pascal Roux^{2,10}, Christine Charrueau¹, Anne-Marie Lachagès¹, Frédéric Charlotte³, Isabelle Brocheriou³, Karine Clément⁴, Judith Aron-Wisnewsky⁴, Fabienne Fougère⁵, Vlad Ratziu^{5,6}, Bernard Hainque^{1,7}, Dominique Bonnefont-Rousselot^{1,7}, Pascal Bigey^{1,8} & Virginie Escriou¹

Hepatic fibrosis is a major consequence of chronic liver disease such as non-alcoholic steatohepatitis which is undergoing a dramatic evolution given the obesity progression worldwide, and has no treatment to date. Hepatic stellate cells (HSCs) play a key role in the fibrosis process, because in chronic liver damage, they transdifferentiate from a “quiescent” to an “activated” phenotype responsible for most the collagen deposition in liver tissue. Here, using a diet-induced liver fibrosis murine model (choline-deficient amino acid-defined, high fat diet), we characterized a specific population of HSCs organized as clusters presenting simultaneously hypertrophy of retinoid droplets, quiescent and activated HSC markers. We showed that hypertrophied HSCs co-localized with fibrosis areas in space and time. Importantly, we reported the existence of this phenotype and its association with collagen deposition in three other mouse fibrosis models, including CCl₄-induced fibrosis model. Moreover, we have also shown its relevance in human liver fibrosis associated with different etiologies (obesity, non-alcoholic steatohepatitis, viral hepatitis C and alcoholism). In particular, we have demonstrated a significant positive correlation between the stage of liver fibrosis and HSC hypertrophy in a cohort of obese patients with hepatic fibrosis. These results lead us to conclude that hypertrophied HSCs are closely associated with hepatic fibrosis in a metabolic disease context and may represent a new marker of metabolic liver disease progression.

Hepatic fibrosis is a wound-healing response to long-term liver injury, including chronic viral infection, excessive alcohol consumption, non-alcoholic steatohepatitis (NASH) or autoimmune liver disease¹. Hepatic fibrosis corresponds to the excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) proteins, collagen fibers in particular, in the liver parenchyma that distorts liver architecture by forming a fibrous scar. Advanced hepatic fibrosis leads to cirrhosis, which results in hepatocellular dysfunction and increased intrahepatic resistance to blood flow, and often requires liver transplantation. A better understanding of fibrogenesis and resolution of fibrosis has revealed a number of potential antifibrotic targets². Although many drug candidates have been tested in preclinical models and many of them are in human clinical trials, none are currently approved by the FDA (Food and drug administration).

Hepatic stellate cells (HSCs), portal fibroblasts, and myofibroblasts of bone marrow origin have been identified as the major extracellular matrix protein producing cells in the injured liver^{3–5}. Among all, HSCs are recognized

¹Université Paris Descartes, UTCBS, CNRS, INSERM, F-75006, Paris, France. ²Institut Pasteur, C2RT, UTechS Photonic BioImaging, Paris, France. ³Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpitaux universitaires Pitié-Salpêtrière-Charles Foix (AP-HP), F-75013, Paris, France. ⁴Sorbonne Université, Inserm, UMRS NutriOmique, Service de Nutrition, Hôpitaux universitaires Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, F-75013, Paris, France. ⁵INSERM, Sorbonne Université, Université de Paris; Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France. ⁶Sorbonne Université, Institute for Cardiometabolism and Nutrition, Hôpital Pitié Salpêtrière, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France. ⁷Service de Biochimie métabolique, Hôpitaux universitaires Pitié-Salpêtrière-Charles Foix (AP-HP), F-75013, Paris, France. ⁸Chimie ParisTech, PSL Research University, UTCBS, F-75005, Paris, France. ⁹These authors contributed equally: Céline Hoffmann and Nour El Houda Djerir. ¹⁰Pascal Roux is deceased. *email: celine.hoffmann@parisdescartes.fr

as the major contributing cells in the fibrosis process: in the presence of chronic inflammation, they transdifferentiate from quiescent state into activated state showing a proliferative myofibroblast phenotype, which accounts for the major source of collagen expression and deposition in the liver tissue⁶. Given the primary role of the activated HSCs in fibrogenesis, they remain central to the development of antifibrotic therapy.

HSCs are localized in the space of Disse, interposed between liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and hepatocytes; they represent ~10% of all resident liver cells. In the normal liver, HSCs maintain a non-proliferative, quiescent phenotype with the main known function of storing vitamin A as retinyl esters into cytoplasmic lipid droplets⁷. The sequence of HSC activation describes a first step of ‘initiation’ that refers to early events like development of a contractile and fibrogenic phenotype and modulation of growth factor signaling, and a second ‘perpetuation’ step characterized by the amplification of the activated phenotype⁸. One major characteristic of activated HSCs is their loss of retinoid store⁷, but today, the contribution of stored retinoids to HSC activation and hepatic fibrosis still remains poorly understood.

Improving our understanding of the pathogenesis of liver fibrosis is based primarily on robust and reproducible experimental animal models. Repetition of a toxic attack on the liver is a classic way of inducing hepatic fibrosis in laboratory animals. One of the most widely used liver toxins for experimental induction of a liver injury is carbon tetrachloride (CCl₄)⁹. Although this kind of hepatotoxic model reproduces some important features of human liver fibrosis, the etiology of the fibrosis is different from that resulting from a chronic metabolic liver disease such as NASH. To recapitulate metabolic liver disease, other models such as nutritional models may be used. Methionine and choline deficient (MCD) diet is the major nutritional model for NASH study and induces macrovesicular steatosis, hepatocellular death, inflammation, oxidative stress, and liver fibrosis¹⁰. However, a disadvantage of using this diet is that mice exhibit dramatic weight loss associated with an increased risk of death limiting the duration of the experiments and the level of hepatic fibrosis obtained. Interestingly, it has been shown that supplementation of 0.1% methionine and high fat in MCD diet, called choline-deficient amino acid-defined and high fat diet (CDAHFD), is able to overcome some of these drawbacks and has several advantages, including that of inducing marked fibrosis, appearing earlier than in other nutritional models, with high inter-individual reproducibility and no mortality¹¹.

While using CDAHFD mouse model in a parallel study to investigate the role of HSCs in the onset and development of hepatic fibrosis in a steatohepatitis context, we found out the existence of clusters of HSCs, characterized by a particular phenotype not previously described in a context of metabolic liver fibrosis.

This paper describes the characterization of this specific population of HSCs and focuses on demonstrating its association with hepatic fibrosis, on several animal models of metabolic liver fibrosis, as well as in a preliminary study on human samples exhibiting liver fibrosis.

Results

CDAHFD induces steatosis, ballooning, inflammation and progressive liver fibrosis. We conducted histopathological assessment of diet-induced liver lesions. Figure 1a shows representative micrographs of Hematoxylin & Eosin (H&E) coloration and Sirius Red stain of mice liver sections after feeding with standard diet (SD) or CDAHFD for 6 and 22 weeks. Steatosis reached the maximum score of 3 from the 3rd week of CDAHFD (Fig. 1c). A grade 2 for lobular inflammation, characterized by inflammatory foci, was observed from the 3rd week and maintained throughout the diet administration (Fig. 1d). Hepatocyte ballooning was also noticed in the livers of CDAHFD-fed mice (Fig. 1b), but not in the livers of SD-fed mice. Moreover, a slight perisinusoidal fibrosis was detected from the 6th week of CDAHFD administration, which started from the centrilobular zone and evolved progressively to a marked stage from 9 weeks and then stabilized throughout the 22 weeks of experiment (Fig. 1e). These liver damages were particularly reproducible since they were found in all CDAHFD-fed mice. The metabolic abnormalities seen in mice fed with CDAHFD for 22 weeks were mainly significant increases in liver weight and in the markers for liver injury, ALT (Alanine transaminase) and AST (Aspartate transaminase) and consistent with the characterization of the model, as previously reported¹¹.

Hypertrophied cells located near collagen fibers occurred in fibrotic livers. Further examination of H&E stained slices revealed cells with a swollen cytoplasm and enlarged by yellow droplets (Fig. 2a arrowheads). These cells, which can be described as hypertrophied, were mainly located in the perisinusoidal space. A score was set to quantify this occurrence by observation at 200x magnification, as follows: 0 = no visible hypertrophy, 1 = small and few hypertrophied cells are visible, 2 = bigger and less than 10 hypertrophied cells per microscopic field, 3 = more than 10 hypertrophied cells visible per microscopic field. This histological feature was detectable from the 6th week of CDAHFD with a high reproducibility (100% of CDAHFD-fed mice exhibited hypertrophied cells), and increased progressively, following the same kinetics as that of fibrosis (Fig. 2c). In addition, analysis of Sirius red-stained sections showed that hypertrophied cells were close to collagen deposition (Fig. 2b, arrowheads). Because of the perisinusoidal localization of the hypertrophied cells as well as their proximity to the collagen fibers, it is reasonable to assume that these cells are HSCs. One of the typical features of HSCs is to contain droplets of retinoids with a well-characterized natural fluorescence¹². Then, to further characterize the hypertrophied cells, we performed fluorescence microscopy analysis on liver slices of SD or CDAHFD-fed mice. On CDAHFD slices, cells located in the perisinusoidal space with strong fluorescent droplet accumulations were observed (Fig. 2e), whereas no fluorescent signal was detected on liver slices from SD-fed mice (Fig. 2d). These fluorescent areas detected on CDAHFD sections corresponded to the hypertrophied cells observed by widefield microscopy (Fig. 2a, arrowhead). Microscopic fluorescent spectral analysis allowed us to analyze these fluorescent droplets on CDAHFD liver slices. A characteristic fluorescence spectrum of retinoids was obtained after excitation ($\lambda_{exc} = 480$ nm) of droplets on CDAHFD-fed mouse liver slice and was superimposed with the one obtained on droplets of primary HSCs purified from SD-fed mouse, that confirmed that they were indeed retinoid droplets (Figs. 2f and S1).

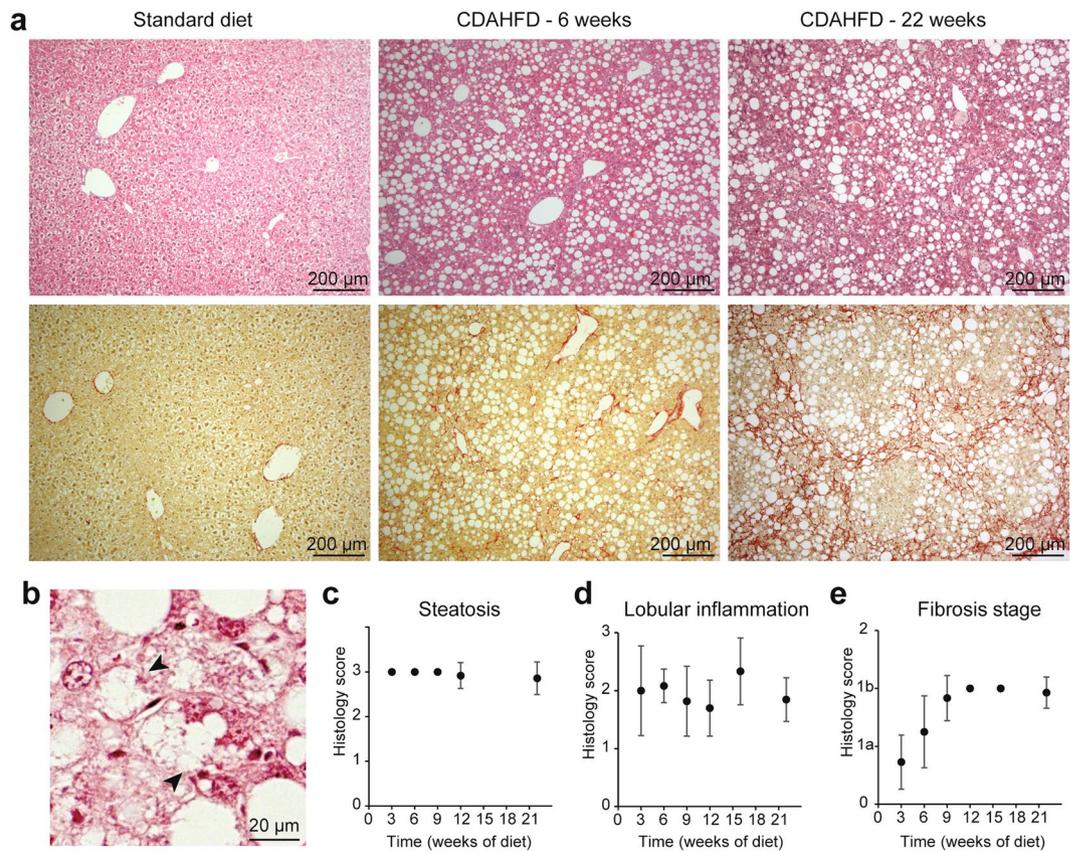


Figure 1. Histological characterization of CDAHFD mice model. **(a)** Histological colorations (top: Hematoxylin/Eosin, low: Sirius Red) of Standard Diet- or CDAHFD-fed mice for 6 or 22 weeks. **(b)** Example of hepatocyte ballooning in a CDAHFD-fed mice (arrowheads). **(c–e)** Histological scores: steatosis **(c)**, inflammation **(d)** and fibrosis **(e)** as a function of time. The points corresponding to 3, 6 and 9 weeks in **(c)** and 12 and 15 weeks in **(e)** are not associated with an error bar because for these points, the values of the scores are identical and the standard deviation is therefore 0. ($n = 10–14$ for each time point, means \pm standard deviation).

These results show that the hypertrophy that we identified on liver cells of CDAHFD-fed mice is due to an increased accumulation of retinoid droplets in their cytoplasm.

Further characterization of retinoid accumulation. We next performed multi-photon microscopy analysis, to detect both the fluorescence of retinoids, termed RF (retinoid fluorescence), and the specific signal of collagen fibers (CF) by second harmonic generation (SHG) microscopy, termed CF/SHG, on the same slice without any treatment. The RF signal corresponding to the accumulation of fluorescent retinoid droplets was closely located to the CF/SHG signal, indicative of collagen fiber deposition (Fig. 3a). Both RF and CF/SHG signals kinetics evolved concomitantly throughout the duration of diet administration (Supplementary Fig. S2), that is consistent with the observation we made previously with classical staining methods (Fig. 2a,b).

Using a pipeline of multiphoton microscopy analysis that we developed, we then carried out a spatio-temporal study of RF and CF/SHG signals. Image analysis was performed with an “in-house” developed macro under Fiji environment. For that, 3 to 22 weeks SD- or CDAHFD-fed mice liver slices were entirely scanned by multiphotonic microscopy both for RF and CF/SHG signals. Depending on its size, the RF signal may correspond to a droplet, several droplets indistinguishable within the same cell or a cluster of cells loaded with droplets. RF signal is processed in order to individualize each RF areas as “patches”, making it possible to count them and to determine the surface of each of them. Regions of interest (ROI) of CF/SHG signal were identified and quantified. Three parameters were obtained from these analyses and plotted as a function of diet time: the percentage of slice area covered by RF signal (Fig. 3b), by CF/SHG signal (Fig. 3d) and the number of RF patches by slice surface unit, or RF density (Fig. 3c). Under CDAHFD, RF signal was detected from the 6th week, while under SD, it was undetectable regardless of the time of diet. RF area as well as RF density increased gradually from week 3 to week 9 of CDAHFD and stabilized until the end of the experiment (22 weeks) with a median of 1.17% of the total surface area (Fig. 3b) and 62 RF patches per mm^2 ($n = 3$) (Fig. 3c). Interestingly, analysis of the RF patches’ size distribution showed that it evolved progressively during CDAHFD administration (Supplementary Fig. S2) showing a gradual increase of frequency of the larger RF patches. Concerning the CF/SHG signal (Fig. 3d), under SD, a basal signal was measured and maintained between 0.2 and 2.5% of the total area of the slice. This is consistent with the presence of collagen around veins and arteries visible in Supplementary Fig. S2 for example. Under CDAHFD, CF/SHG signal increased from a median of 5.3% at 3 weeks of diet and evolved progressively until 9 weeks of

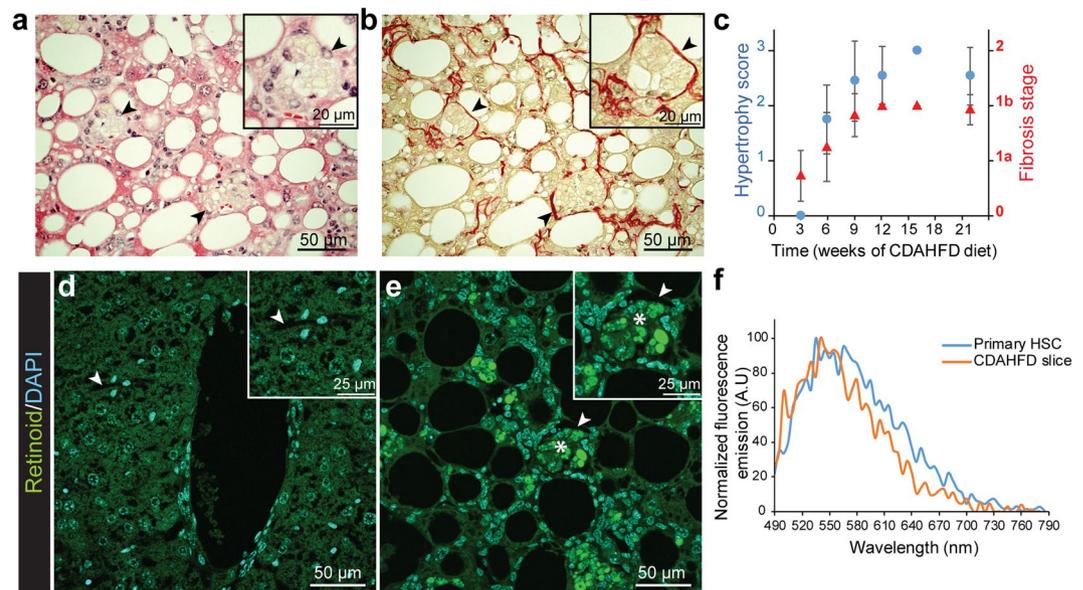


Figure 2. Hypertrophied cells are collocated with collagen fibers and full of fluorescent droplets. **(a,b)** Collocation (arrowheads) of hypertrophied cells **(a, HE staining)** and collagen fibers **(b, Sirius Red staining)** at 9 weeks of CDAHFD. **(c)** Cell hypertrophy (blue dots) and fibrosis (red triangles) scores as a function of CDAHFD time. ($n = 10\text{--}14$ for each time point, means \pm standard deviation). **(d,e)** Combined images of DAPI (cyan, $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm) and retinoid (green, $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm) fluorescent signals on 9 weeks SD- **(d)** and CDAHFD-fed mice **(e)** liver slices. (Arrowheads: sinusoidal space, stars: retinoid fluorescent droplets). **(f)** Normalized fluorescence emission spectra of retinoid droplets in primary murine HSCs (blue) and 12 weeks CDAHFD-fed mouse liver slice (orange), measured by confocal microscopy ($\lambda_{\text{exc}} = 480$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 490\text{--}790$ nm).

diet to attain a median of 12.3% of the total slice area. The algorithm we designed allowed us to analyze the spatial repartition of RF and CF/SHG signals. As shown in Fig. 3e, marked perisinusoidal fibrosis was observed in the liver centrilobular areas without invading the periportal areas. RF accumulation was highly concentrated in the centrilobular area as shown by the HeatMap on Fig. 3e. Hence, multiphoton microscopy allowed us both to highlight the onset of retinoid droplet-containing hypertrophied cells associated with collagen deposition and to quantify their simultaneous progression as a function of diet time.

This result is however contradictory with the accepted concept that HSCs lose their retinoid droplets when they differentiate into myofibroblasts and produce collagen. We then quantified, using retinoid extraction and HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) analysis, the total amount of retinyl esters (retinoid storage form in HSCs) and retinol (free form of retinoids in liver) present in the liver of SD- or CDAHFD-fed mice at different times. Under SD, the level of retinyl esters tended to increase with time, whereas it was significantly lower under CDAHFD, as early as 3 weeks and throughout the experiment (Fig. 3f). The same result was observed for retinol (Supplementary Fig. S3). Overall, mice lost their retinoid stock that is consistent with the dogma of retinol loss by HSCs at the time of their activation⁷. Considering the total liver assay result, it can be proposed that in SD-fed mice, retinyl esters are stored in small amounts in HSCs, undetectable by fluorescence in thin liver sections, because signal is below the fluorescence detection limit. Interestingly, detection of RF become possible, on thicker (50 μm) sections of SD-fed mice liver (data not shown). In CDAHFD-fed mice, during establishment of fibrosis, HSCs activate and lose their retinoid storage leading to the decrease of the overall liver retinoid quantity. However, some cells would retain the remaining retinoids in particular areas where retinol will be “over-concentrated” in hypertrophied cells.

Expression of hepatic stellate cells specific markers. To further characterize these areas of hypertrophied cells, we investigated the expression of HSC markers: desmin, an intermediate filament expressed in HSCs regardless of their activation status¹³, and cRBP1 (cellular retinol binding protein-1), a protein involved in the transport of retinol and strongly expressed in HSCs¹⁴ (Fig. 4). On SD slices, an elongated shape labelling of desmin was detected on cells along the perisinusoidal space (Fig. 4a). On CDAHFD slices, desmin labelling was detected at a greater frequency, showing together an elongated shape and a more rounded shape (Fig. 4b). The overlap of desmin and RF signals showed two populations of desmin-positive cells, one population that presented also fluorescent droplets of retinoids (stars, Fig. 4c), and another population that was positive for desmin with no RF (arrowheads, Fig. 4c). Both desmin-positive populations were observable from the 3rd week of diet and desmin signal increased progressively with diet duration (Supplementary Fig. S4). Zoom-in on a representative hypertrophy area showed that desmin labelling surrounded the area of accumulated retinoid droplets (Fig. 4d). Quantification showed desmin positivity in 80% of the clusters of hypertrophied cells after 9 and 12 weeks of diet.

On SD slices, cRBP1 labelling was observed on cells located in perisinusoidal space (Fig. 4e). On CDAHFD slices, a large, highly localized labelling was present always in areas of cell hypertrophy (Fig. 4f,g). Indeed, 91% of

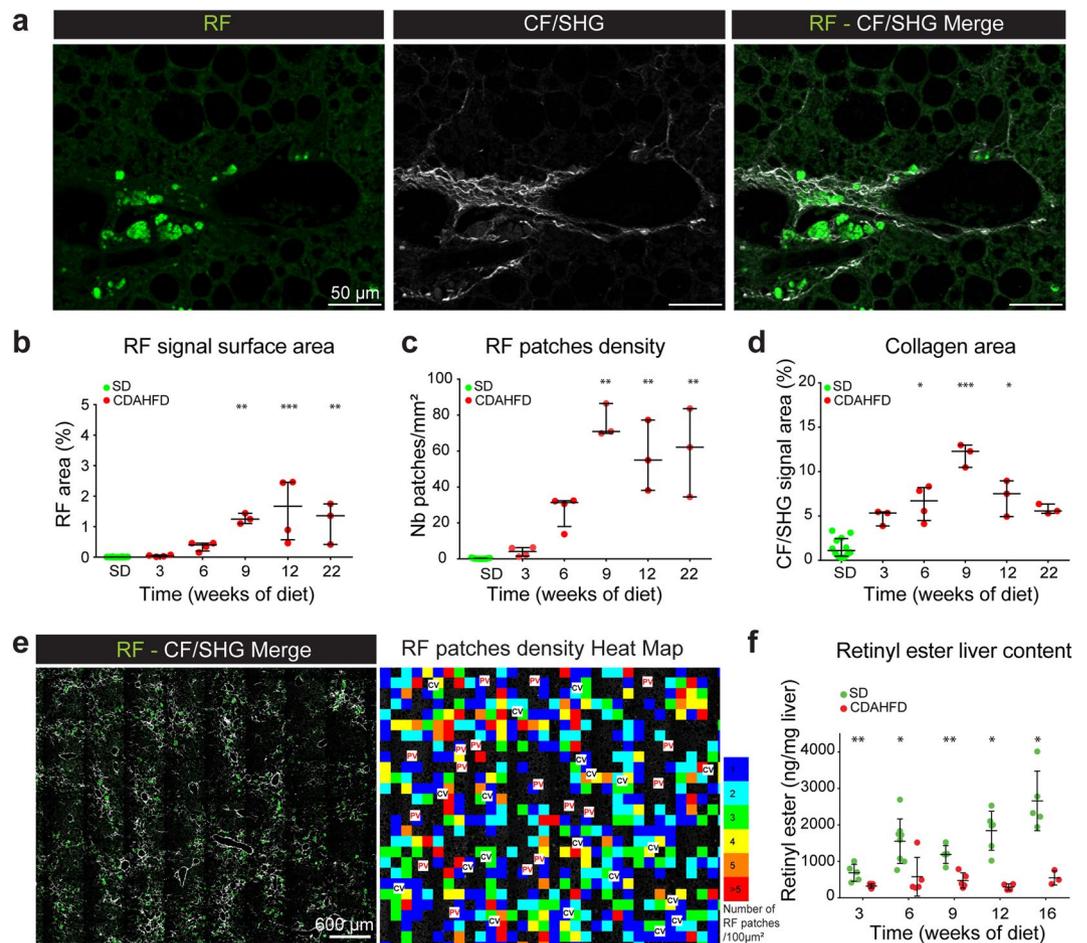


Figure 3. Spatio-temporal analysis of retinoid fluorescence (RF) and collagen fibers (CF/SHG). **(a)** Example of collocation of retinoid fluorescence (RF) imaged by fluorescence (left) and collagen fibers imaged by second harmonic generation (CF/SHG) (middle) microscopy. Right: merge of RF and CF/SHG signals. **(b)** Percentage of RF signal surface area on total SD- or CDAHFD-liver slices as a function of time. **(c)** RF patches density (number of RF patches per mm^2) of total SD- or CDAHFD-liver slices as a function of time. **(d)** Percentage of CF/SHG signal surface area on total SD- or CDAHFD-liver slices as a function of time. **(b–d)** Statistics: $n = 3–12$ for each group, median with interquartile range, Kruskal Wallis test. **(e)** Merge of RF and CF/SHG signals of 9 weeks CDAHFD-fed mouse liver slice (left). Heat map of RF patches density of the same liver slice (right). Color scale = number of RF patches for a $100 \times 100 \mu\text{m}$ square. PV = Portal Vein, CV = Centrilobular Vein. **(f)** Total liver content in retinyl esters measured by HPLC as a function of time of SD or CDAHFD. ($n = 4–7$ for each condition, means \pm standard deviation, Mann-Whitney test). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

clusters of hypertrophied cells were cRBP1-positive ($n = 700$ counted areas). Contrary to what was observed with desmin, no cRBP1 labelling was observed on cells lacking retinoid signal. cRBP1 labelling increased progressively with diet time and every cRBP1 positive cell exhibited accumulation of retinoid droplets (Supplementary Fig. S4). Zoom-in of a hypertrophy area showed an intense labelling of cRBP1 in hypertrophied cells closely surrounding retinoid droplets (Fig. 4h).

Under SD, we observed perisinusoidal cells showing both desmin and cRBP1 labelling, characteristic of HSCs. Under CDAHFD, two types of cells were characterized: perisinusoidal desmin positive cells without RF signal and hypertrophied cells in specific areas showing retinoid droplet accumulation and both desmin and cRBP1 labelling. Hence, it can therefore be assumed that retinoid droplets-containing hypertrophied cells in these specific area are of stellate type.

We next investigated the distribution of markers of activated HSCs on CDAHFD and SD-fed mouse liver slices.

Expression of activated HSCs markers. Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) is a widely accepted marker of activated HSC¹⁵. On SD-fed mouse liver slices, α -SMA labelling was only detected around the veins (Fig. 5a), whereas for CDAHFD-fed mice, a significant labelling was detected throughout parenchyma (Fig. 5b). α -SMA labelling in the parenchyma was observed from the 3rd week of diet and increased progressively under diet (Supplementary Fig. S4). Zoom-in on an area of hypertrophy highlighted that α -SMA labelling surrounds

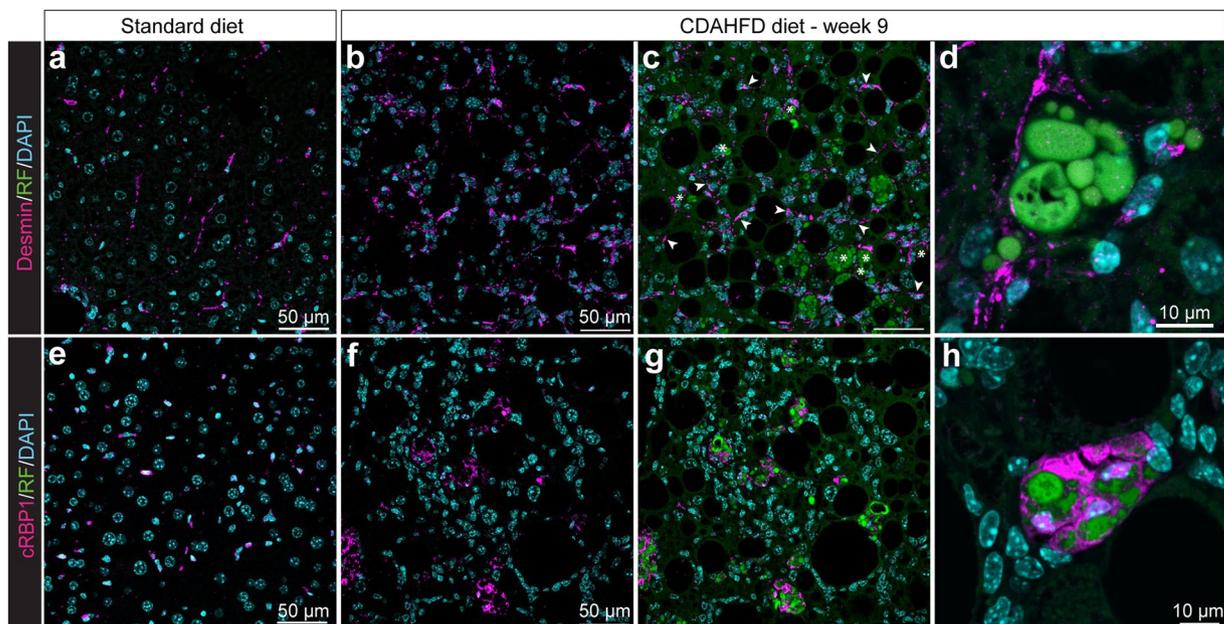


Figure 4. Expression of specific HSC markers in hypertrophy areas. (a–d) Desmin labelling of 9 weeks SD- (a) and CDAHFD-fed mice (b–d) liver slices. Overlap of DAPI, RF and desmin signals (a,c,d) or DAPI and desmin signal (b). Arrowheads: desmin-positive cells. Stars: desmin- and retinoid-positive cells. (e–h) cRBP1 labelling of 9 weeks SD- (e) and CDAHFD-fed mice (f–h) liver slices. Overlap of DAPI, RF and cRBP1 signals (e,g,h) or DAPI and cRBP1 (f).

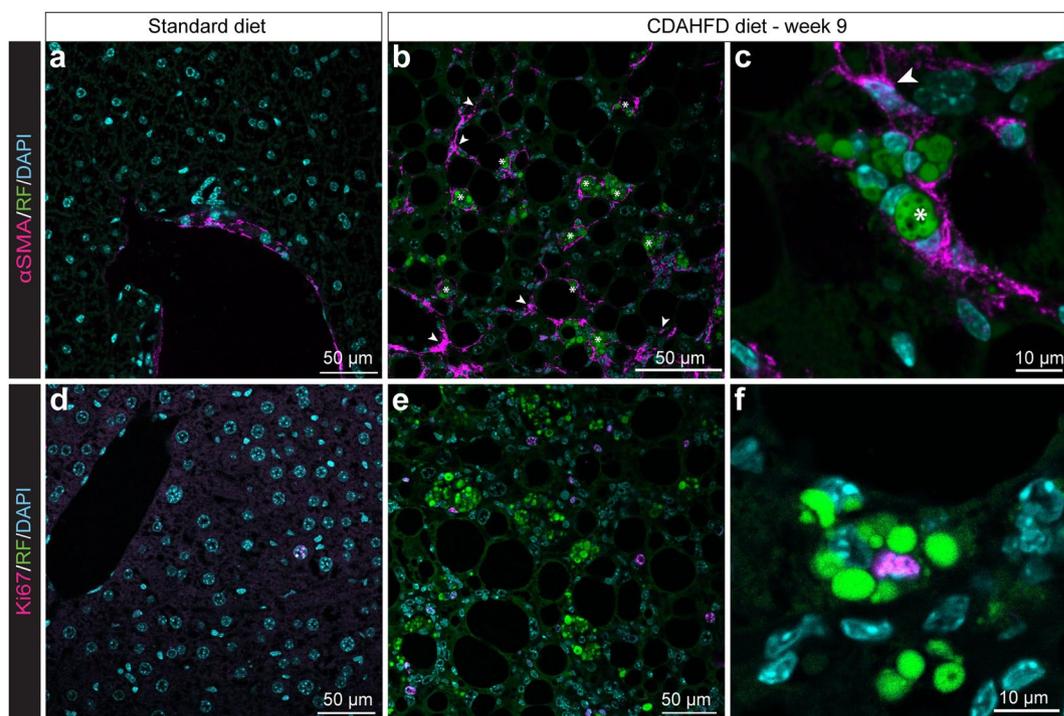


Figure 5. Expression of markers of activated HSCs in hypertrophy areas. (a–c) α -SMA labelling of 9 weeks SD- (a) and CDAHFD-fed mice (b,c) liver slices. Overlap of DAPI, RF and α -SMA signals. Arrowheads: α -SMA-positive cells; stars: α -SMA- and retinoid-positive cells. (d,e) Ki67 labelling of 9 weeks SD- (d) and CDAHFD-fed mice (e,f). Overlap of DAPI, RF and Ki67 signals.

exactly the shape of the droplets, indicating the simultaneous presence of α -SMA and retinol droplets in the hypertrophied cells (Figs 5c and S4D). We quantified 92.5% of clusters of hypertrophied cells surrounded with α -SMA labelling at 12 weeks of diet ($n > 200$ events). Moreover, as we observed for desmin, some α -SMA positive

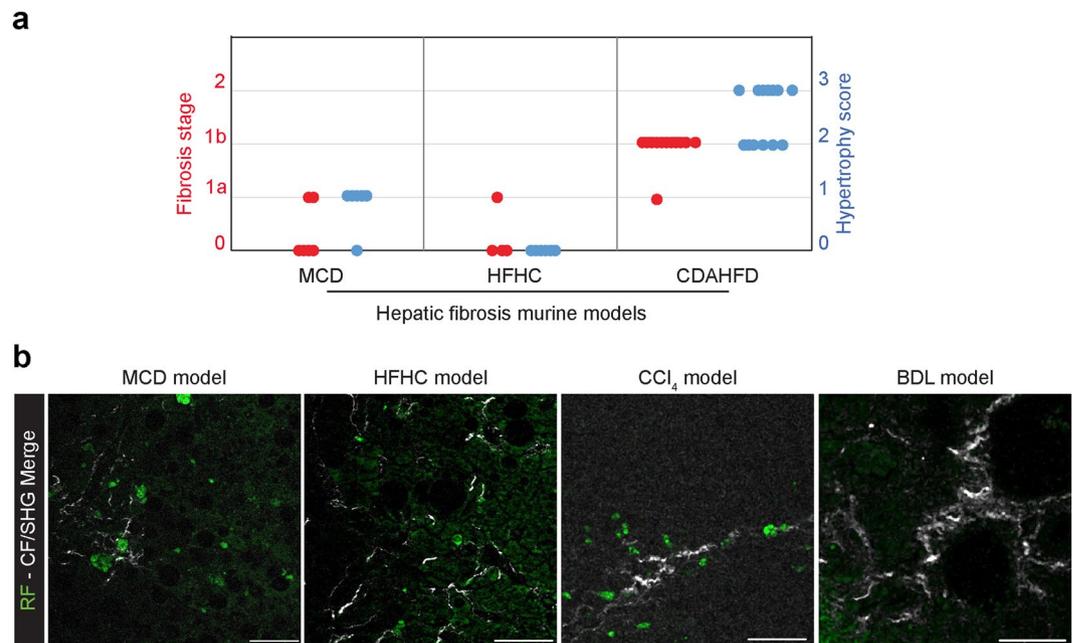


Figure 6. Hypertrophy of HSC is not model-dependent. **(a)** Liver fibrosis (red dots) and HSC hypertrophy scores (blue dots) on 9 weeks MCD diet-fed mice, 16 weeks HFHC diet-fed mice and 22 weeks CDAHFD-fed mice. **(b)** Merge of retinoid fluorescence (RF) imaged by fluorescence and collagen fibers imaged by second harmonic generation (CF/SHG) microscopy on liver section of 9 weeks MCD-, 16 weeks HFHC-, BDL- and CCl₄- treated mice. Scale bar: 50 μ m.

cells were retinoid signal-free. We then investigated the proliferative state of hypertrophied cells using Ki67 labelling. For SD-fed mice, some rare positive nuclei were observed (Fig. 5d). For CDAHFD-fed mice, Ki67 labelling was much more frequent and seen both in the parenchyma and in areas of cell hypertrophy, demonstrating the regenerative state of the liver upon injury (Fig. 5e). Ki67-positive cells were however less common in areas of hypertrophy, accounting for 14% of labelled cells at 9 and 12 weeks of diet. Magnified imaging of hypertrophied cells showed a cell ongoing division surrounded by retinoid droplets (Fig. 5f).

To conclude on immunofluorescence experiments, cells localized on hypertrophy areas presented both the characteristics of non-activated HSCs as they kept their retinoid storage capacity and were desmin and cRBPI positive, and the characteristics of activated HSCs as they expressed α -SMA and were proliferating. Moreover, we found that, in the liver of CDAHFD-fed mice, two populations of HSCs coexist, one population of “isolated” activated stellate cells expressing desmin and α -SMA and one population, accumulated in hypertrophy areas that were neither activated nor quiescent and presents an intermediary phenotype with exacerbated number of retinoid storage droplets. To our knowledge, this phenomenon has never been described in a liver fibrosis context, neither in human fibrosis nor in animal models of fibrosis.

HSC hypertrophy is not model-dependent. We next investigated the presence of hypertrophied HSCs on two other murine metabolic models of hepatic fibrosis by submitting mice to Methionine and Choline Deficient diet (MCD) for 9 weeks or High-Fat and High-Carbohydrate (HFHC) diet for 16 weeks which are the typical maximal times of diet to obtain fibrosis using these models^{10,16} (Figs. 6a and S5). After 9 weeks of MCD diet, few mice (2/6) showed a light fibrosis (score 1a) while a majority of them showed a moderate form of HSC hypertrophy (5/6). After 16 weeks of HFHC diet, even less mice (1/6) showed a light fibrosis (score 1a) and no HSC hypertrophy was observed (Fig. 6a).

Multi-photon analysis showed that retinoid hypertrophy (RF signal) was also detectable on liver slices of MCD and HFHC diets-fed mice and these hypertrophy areas were always associated with collagen deposits, detectable thanks to SHG (Fig. 6b). Moreover, we also performed multi-photon microscopy analysis of liver sections from mice treated with CCl₄ or having undergone bile duct ligation (BDL). Interestingly, we found no retinoid fluorescence accumulation on BDL- mice liver slices, neither in the parenchyma, nor in collagen deposit areas. On the other hand, on liver slices of CCl₄-treated mice, we found the presence of retinoid fluorescence accumulation at the level of collagen deposits (Fig. 6b).

Taken together, these results show that the phenomenon of HSC hypertrophy is not model-dependent.

HSC hypertrophy is observed in human liver fibrosis. To go further, we analyzed human liver biopsies to detect the potential presence of hypertrophied HSC. Human liver biopsies obtained from severely obese patients and presenting different levels of hepatic fibrosis (27 human biopsies ranging from F0 to F4, $n \geq 4$ per stage, Supplementary Table 1) were analyzed by confocal microscopy to specifically detect the RF signal of HSC hypertrophied cells through fluorescent spectral analysis. A score of human HSC hypertrophy was set to quantify

We have observed in the literature the occurrence of similar hypertrophied cells (although not expressly mentioned as such) in various models of fibrosis ranging from the toxic CCl_4 model of liver fibrosis, (Figure 9 in²⁰) to nutritional models of fibrosis such as MCD model (Fig. 3 in²¹), or its derivatives like CDAHFD (Figure 8 in¹¹), CDAA (Choline-deficient amino acid, Fig. 2 in²²), and also in a mixed toxic and nutritional model, i.e. STAM mice (streptozotocin injection combined with high-fat diet²³). Although clearly visible in the figures showing sections of injured liver, the presence of these areas of hypertrophy has not been described by the various authors. For our part, we also showed the presence of these clusters of hypertrophied cells in three other liver fibrosis models in mice (MCD, HFHC and CCl_4). Interestingly, no retinoid fluorescence accumulation was found on BDL-mice liver slices. BDL is a cholestatic model of liver injury for which fibrosis is mostly originating from periportal myofibroblasts contrary to diet-induced and CCl_4 models for which fibrosis originates mostly from hepatic stellate cells^{4,24}. Thereby, the absence of hypertrophied HSC in BDL-related fibrosis liver slice is probably due to the fact that HSCs are not as involved in the BDL-induced fibrogenesis than in the diet-induced or CCl_4 -induced fibrosis.

Therefore, as we found hypertrophied HSCs in mice liver sections, but also in human liver sections with fibrosis it can be concluded that the presence of hypertrophied cells neither depends on the model nor on the species.

We also showed in CDAHFD-fed mice that HSC hypertrophy was closely related to fibrosis, in terms of onset and growth kinetics, as well as in terms of localization within the liver tissue. This result has been made possible by the combination of second harmonic generation and fluorescence microscopy analysis. These techniques are much more sensitive than conventional histological staining methods, requiring no treatment of the liver slice but more sophisticated equipment. Using these microscopy techniques on two mouse models of diet-induced liver fibrosis causing different levels of fibrosis (moderate for MCD and very modest for HFHC), we showed that HSC hypertrophy was associated with fibrosis. Similarly, biopsies of obese patients with liver fibrosis showed a significant correlation between the grade of fibrosis and the presence of HSC hypertrophy as well as collocation of both phenomena. Moreover, hypertrophied HSCs were observed in CCl_4 mice liver sections and in human liver sections from etiologies without steatohepatitis (NASH, VHC or alcoholism). These results strengthen our hypothesis that HSC hypertrophy is linked with HSC-induced fibrosis rather than with steatohepatitis.

The occurrence of HSCs containing large amounts of retinoids in the vicinity of the collagen deposition areas seems in contradiction with the well-established fact that, when HSCs become activated and produce collagen, they lose their retinoid droplets. However, it has not been yet unequivocally determined whether the loss of HSC lipid droplets is a cause or a consequence of their activation. For example, a recent study showed that HSCs activated *in vitro* or *in vivo* after liver injury (by bile duct ligation) retained their droplets with a decrease in their retinoid content occurring only after the onset of cell transdifferentiation²⁵. Another study suggested that the absence of retinoid-containing droplets in HSCs (in LRAT-deficient mice) did not cause spontaneous fibrosis, nor did it promote fibrosis induced by bile duct ligation or CCl_4 administration²⁶. Thus, although the loss of HSCs droplets is a widely recognized hallmark of liver fibrosis development, it remains to be established at the molecular level why and how these droplets are lost.

The characterization of the cells forming the hypertrophy clusters, using HSC specific markers immunolabelling, suggested that several HSC populations coexist in these areas. Indeed, we observed that these clusters of cells exhibited the expression of (i) a HSC-specific marker, regardless of their status, such as desmin, (ii) a marker linked to the storage process of retinoids, such as cRBP1, (iii) a specific marker of activated HSC such as α -SMA, and (iv) a proliferation marker, such as Ki67. Collocation of these different markers within hypertrophy clusters can be explained by the coexistence of several HSC populations in these particular areas. HSCs are versatile cells in their ability to acquire different phenotypes during liver injury: quiescent, activated, dedifferentiated in myofibroblasts. Even in a healthy and uninjured mouse liver, the HSC population has been reported to be heterogeneous, with a subset of the total HSC population expressing markers of early HSC activation¹⁹. This leads us to propose that during the onset of liver fibrosis, a reorganization of the tissue occurs, accompanied by heterogeneous storage of retinoids, giving rise to a particular phenotype of hypertrophied HSCs.

The next challenge will be to decipher the underlying mechanisms and signals that lead to HSC hypertrophy. We hypothesize that the onset of hypertrophied HSC is probably due to fairly complex signals that could together involve several types of liver cells and the state of the surrounding extracellular matrix. This is why it seems to us that to identify these mechanisms and signals, studies based on organoid cultures reproducing the injured liver microenvironment will be necessary. Another challenge will be to assess the consequences of hypertrophy on the known functions of HSC. This will require isolating hypertrophied HSCs, adapting the protocols that have been designed for non-hypertrophied HSCs and non-steatotic livers. As the principle of separation of HSCs is based on their lower density compared with other hepatic cells, the presence of hepatocytes loaded with lipids in steatotic liver can interfere with the purity of the preparation. The hypertrophied HSC isolation protocol from CDAHFD-fed mice is being developed in our lab.

In conclusion, the existence of a particular hypertrophied phenotype of HSCs closely related to liver fibrosis is of great interest for the study of the role of HSCs in the process of fibrogenesis. This interest also comes from the fact that this phenotype appears in an *in vivo* context with both inflammation and steatosis. Further characterization of these hypertrophied HSCs would shed light on the mechanisms of HSC activation but also would allow the identification of genes potentially involved in fibrogenesis which would constitute targets for a therapeutic strategy based on RNA interference. Thus, by administration of specific siRNAs, the silencing of these genes could induce an anti-fibrotic effect.

Material and Methods

Animals and experimental design. 6 week-old male C57BL/6 mice (Janvier Labs Inc., Rennes, France) were housed in cages (5 per cage) and were kept at 23 ± 3 °C with a 12:12 h light/dark cycle. 90 mice were divided into 2 experimental groups and fed either a standard diet (SD, Specific Diet Services, England 841201, vitamin A content 8000 UI/kg) or a choline-deficient, L-amino-acid-defined, high-fat diet with 0.1% methionine (CDAHFD, Safe Diets, France U8958P Version 0247, vitamin A content 5280 UI/kg) for 22 weeks. Two other groups of 15 mice each were fed either with a methionine and choline deficient diet (MCD, Safe Diets, MCD AIN 76, vitamin A content 4424 UI/kg) for 9 weeks, or with a High Fat and High Carbohydrate diet (HFHC, Safe Diets, 260HF, vitamin A content 5207 UI/kg) plus water supplemented by fructose (23.1 g/L) and sucrose (18.9 g/L) for 16 weeks. All animal experiments were approved by the Ethics Committee for Experimentation of Paris Descartes University and authorized by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research (APAFiS #4029-2016020513385222v1).

During the experimental period, mice body weight was recorded once a week. At each time point mice were deeply anesthetized (ketamine/xylazine 100/10 mg/kg, *i.p.*) during the light cycle, for blood collection by cardiac puncture and then euthanized by cervical dislocation. The liver was rapidly excised and weighed, the different lobes were separated, fixed in 4% buffered formaldehyde solution for histology analysis or snap frozen for biochemical analyses.

Paraffin embedded liver sections from mice treated with CCl₄ or having undergone bile duct ligation (BDL) were obtained from Dr Foufelle. For CCl₄-induced liver fibrosis, 8 week old C57Bl/6 mice received intraperitoneal injections of a CCl₄ solution (1 g CCl₄ per kg of body weight in olive oil) twice a week for 8 weeks⁹. For BDL, 8 week old C57Bl/6 mice were ligated during 10 days as described previously²⁷.

Human samples. Human liver samples (surgical biopsy samples) were obtained from 27 severely obese patients during their bariatric surgery and presenting several fibrosis stages: F0 (n = 4), F1 (n = 5), F2 (n = 9), F3 (n = 5) and F4 (n = 4). Patients are part of a clinical research protocol (i.e. FIBROTA, number P100503 -IDRCB 2011-A00759-32), which was recorded on the clinical trial website (NCT01655017). 16 human liver samples were also obtained from patients who underwent liver biopsy between 2008 and 2019 for suspicion of NASH (n = 4) or Viral Hepatitis C (n = 7) and alcoholism (n = 5) and referred to the Hepatogastroenterology Department of the Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France. The biopsies were embedded in paraffin, cut into 3 µm-thick paraffin sections and routinely picosirius-Hemalun-stained for fibrosis staging or unstained for fluorescence microscopy analysis. For each biopsy, the stage of fibrosis (F from F0 to F4) was assessed according to NASH-CRN scoring system²⁸ with the single modification of pooling the three substages (1a, 1b and 1c) into a single F1 score, or according to METAVIR score in patients with other causes of liver fibrosis.

The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration. Human data and biosample collection were approved by the Ethics Committee (CPP Ile-de-France 1). All subjects provided written informed consent before liver biopsy or when included in the Fibrota clinical trial (NCT01655017).

Plasma biomarker assays. Plasma biomarker assays were performed with an Olympus AU 400 multiparameter, in the Biochemistry Platform of Centre de Recherche sur l'Inflammation (CRI) CNRS - UMR 1149 Université Paris Diderot.

Histology. Paraffin embedded liver sections (4 µm thick) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or Sirius red and scored in a blinded manner for the degree of steatosis, inflammation and fibrosis by an experienced pathologist. Steatosis was graded as follows based on the average area (%) of fat droplets: 0, 0%; 1, 1 to 33%; 2, 34 to 66%; 3, 67 to 100%. Inflammation was graded based on the number of inflammatory foci as follows: 0: none; 1: <2 foci per lobule; 2: between 2 and 4 foci per lobule; 3: >4 foci per lobule. The staging of hepatic fibrosis was classified into stages 0 to 4 (stage 0: none; stage 1a: mild centrilobular and perisinusoidal fibrosis; stage 1b: moderate centrilobular fibrosis; 1c: portal fibrosis; stage 2: severe, perisinusoidal and periportal fibrosis; stage 3: bridging fibrosis; and stage 4: cirrhosis).

Immunohistochemistry. Antibodies (Abcam) against desmin (ab15200; 1/200), c-RBP1 (ab154881; 1/500), α-SMA (ab124964, 1/1000) and Ki67 (ab16667; 1/500) were used for immunohistochemistry on 4 µm paraffin liver sections previously dewaxed and unmasked in sodium citrate buffer (0.1 M; pH 6). AlexaFluor647 conjugated secondary antibody (Fisher Scientific, A21244; 1/500) was then incubated for 1 h at RT and nuclei were stained using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 0.3 µg/mL, Sigma-Aldrich, D1388). The slides were then examined under confocal fluorescence microscopy, (SP8 Leica Microsystems) at 400X magnification. Images were acquired using the software Leica Acquisition System X and treated using open source Fiji software.

Multiphotonic and second harmonic generation microscopy. Multiphotonic microscopy was performed using an LSM 710NLO laser-scanning microscope (Zeiss) equipped with a 20 × dry objective with numerical aperture of 0.8 (Achromplan; Zeiss). The whole tissue sections were entirely scanned by tiling (with an overlap of 10%) multiple 512 × 512 pixel frames. Each tissue section was also scanned for a Z-stack of 3 µm steps with no image average. The Chameleon Ultra Ti:Sapphire laser (Coherent) was tuned at 810 nm. Signals were collected using non-descanned detectors (Zeiss). The second harmonic generation (SHG) signal was detected through a bandwidth filter 395 to 425 nm of a non-descanned detector in a backscattering geometry. Simultaneously, the retinoid fluorescence (RF) signal was detected through a bandwidth filter 500 to 550 nm of a non-descanned detector in a backscattering geometry. The quantitative analysis of multiphoton microscopy images was made through a home-made automated image analysis workflow implemented in Fiji (NIH, Bethesda, MD, USA) environment as a macro.

Microscopic spectral analysis. Images have been generated on a SP8 confocal microscope (Leica) in a spectral detection mode. Samples were excited either with a 405 nm laser and the emission signal was detected between 420 nm and 650 nm with a spectral window of 5 nm or with a 480 nm laser and emission signal was detected between 490 nm and 790 nm. By selecting a region of interest on the background or on the retinoid droplets signal, we generated specific spectra for the tissue background and for the retinoids. For each sample (primary HSC, mice liver tissue, human biopsies) we took spectral acquisition images and performed a spectral separation, using the Dye Separation tool of confocal software (Leica Application Software X) based on the specific signal of retinoids generated (HSC primary cells) previously. This allowed us to obtain both the fluorescence emission spectra and the separate images of tissue autofluorescence (background) and retinoid signal on all samples analyzed. For human biopsy image analysis, we carried out a spectral separation of retinoid signal based on the specific spectra of primary HSC retinoids, which allowed us to confirm that the fluorescent signal observed was specific for retinoids.

Liver retinoid content measurement by high-performance liquid chromatography (HPLC). 40–50 mg of frozen liver tissue were homogenized in PBS (phosphate buffered saline) using a Precellys homogenizer (CK14 beads, 03961-1-0032, Ozyme, France). In order to monitor the extraction yields, 2.5 µg of internal standard (IS, retinyl acetate (Sigma; R4632-1G) in ethanol) were added to each sample. Samples were homogenized by sonication for 2 min at RT using an ultrasonic sonifier (Duty cycle: 10%; Output control: 1. Branson 450 Sonifier - Analog Cell Disruptor). Retinoids present in the homogenates were extracted 5 times with cyclohexane. The cyclohexane phases containing retinoids were then evaporated using a speedVac™ for 30 minutes. Retinoid analysis was performed by reverse-phase chromatography on a HPLC system (Waters Symmetry® 150 × 4.6 mm, C18, 5 µm column) at a flow rate of 1.5 ml/min, using 70% acetonitrile, 15% methanol, 15% methylene chloride as the running solvent for 10 min, followed by 89% acetonitrile, 11% water, 0.1% formic acid for 20 min. Injection volume was 10 µL for all samples. Retinoids were identified and quantified by UV absorbance at 325 nm. Stock standard ethanolic solutions of retinol (Alfa Aesar; J62079), retinyl acetate and retinyl palmitate (Alfa Aesar; J63022) were prepared and used for calibration curves determination (see an example of HPLC chromatogram in Supplementary Fig. S3). Quantification was performed as follows: for each sample, extraction yield was assessed using the retinyl acetate calibration curve. Retinol and retinyl esters were quantified according to retinol and retinyl palmitate calibration curves, respectively, and then corrected according to the determined extraction yield to obtain the actual quantity in each sample.

Primary murine HSC purification. Murine HSCs were isolated from standard diet-fed mice as follows. Briefly, mice were deeply anesthetized with a lethal dose of anaesthetics (ketamine/xylazine 200/20 mg/kg, i.p.). Then a laparotomy and an *in situ* perfusion through the superior vena cava were performed with pre-heated (37 °C) perfusion buffer (25 mM HEPES, 1.2 mM KH₂PO₄, 2.3 mM KCl, 86 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, pH 7.6). Then the portal vein was cut and perfusion continued with 45 ml of perfusion buffer at a flow rate of 4 ml/min. Liver perfusion was followed with 30 mL of digestion buffer (25 mM HEPES, 2.3 mM KCl, 86 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.6) containing Collagenase type I (Gibco 17100-017, 205 U/mg, 1 mg/ml) and Dispase (Gibco 17105-041, 1.79 U/mg 0.56 mg/ml). The liver was then removed, cut in small pieces and incubated in 20 ml of digestion buffer at 37 °C for 20 minutes. The digested liver suspension was filtered through a 70 µm cell strainer and washed with Gey's Balanced Salt Solution (GBSS, 0.4 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM NaHCO₃, 0.2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.3 mM MgSO₄, 5.5 mM Glucose, 2 mM CaCl₂, pH 7.4). HSCs were isolated from the resulting cell suspension by a Nycodenz gradient centrifugation. HSCs were collected at the interface between GBSS buffer and cell-Nycodenz solution, washed and seeded on uncoated plastic tissue culture dishes in DMEM supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum), and antibiotics (1% Penicillin/streptomycin), and then cultured in 5% CO₂ humidified atmosphere at 37 °C. Growth medium was changed daily.

Statistical analysis. Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.©, USA) was used for statistical analysis. Data were analyzed by Mann–Whitney test or Kruskal–Wallis test after being assessed for non-normal distribution. Spearman's rank correlation coefficient was calculated in Excel. The number of repetitions and statistical tests used for each data set is indicated in the figure legends. Statistical significance is indicated on the graphs with asterisks (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.005; ****p < 0.0005).

Received: 31 July 2019; Accepted: 14 February 2020;

Published online: 02 March 2020

References

- Hernandez-Gea, V. & Friedman, S. L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech.* **6**, 425–456, <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130246> (2011).
- Koyama, Y., Xu, J., Liu, X. & Brenner, D. A. New Developments on the Treatment of Liver Fibrosis. *Digestive Dis.* **34**, 589–596, <https://doi.org/10.1159/000445269> (2016).
- Friedman, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* **88**, 125–172, <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007> (2008).
- Iwaisako, K. *et al.* Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, E3297–E3305, <https://doi.org/10.1073/pnas.1400062111> (2014).
- Lemoine, S. *et al.* Portal Myofibroblasts Promote Vascular Remodeling Underlying Cirrhosis Formation Through the Release of Microparticles. *Hepatology* **61**, 1041–1055, <https://doi.org/10.1002/hep.27318> (2015).
- Tsuchida, T. & Friedman, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 397–411, <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38> (2017).
- Blaner, W. S. *et al.* Hepatic stellate cell lipid droplets: A specialized lipid droplet for retinoid storage. *BBA - Mol. Cell Biol. L* **1791**, 467–473, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.11.001> (2009).

8. Friedman, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* **275**, 2247–2250, <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2247> (2000).
9. Liedtke, C. *et al.* Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis tissue repair* **6**, 19–19, <https://doi.org/10.1186/1755-1536-6-19> (2013).
10. Ramadori, P., Weiskirchen, R., Trebicka, J. & Streetz, K. Mouse models of metabolic liver injury. *Lab. Anim.* **49**, 47–58, <https://doi.org/10.1177/0023677215570078> (2015).
11. Matsumoto, M. *et al.* An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int. J. Exp. Pathol.* **94**, 93–103, <https://doi.org/10.1111/iep.12008> (2013).
12. Mederacke, I., Dapito, D. H., Affo, S., Uchinami, H. & Schwabe, R. F. High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nat. Protoc.* **10**, 305–315, <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.017> (2015).
13. Niki, T. *et al.* Comparison of glial fibrillary acidic protein and desmin staining in normal and CCl₄-induced fibrotic rat livers. *Hepatology* **23**, 1538–1545, <https://doi.org/10.1053/jhep.1996.v23.pm0008675175> (1996).
14. Van Rossen, E. *et al.* Vinculin and cellular retinol-binding protein-1 are markers for quiescent and activated hepatic stellate cells in formalin-fixed paraffin embedded human liver. *Histochem. Cell Biol.* **131**, 313–325, <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0544-2> (2009).
15. Nouchi, T., Tanaka, Y., Tsukada, T., Sato, C. & Marumo, F. Appearance of alpha-smooth-muscle-actin-positive cells in hepatic fibrosis. *Liver* **11**, 100–105 (1991).
16. Kohli, R. *et al.* High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **52**, 934–944, <https://doi.org/10.1002/hep.23797> (2010).
17. Mounajjed, T., Graham, R. P., Sanderson, S. O. & Smyrk, T. C. Clinical associations of hepatic stellate cell (HSC) hyperplasia. *Virchows Arch.* **465**, 57–65, <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1582-x> (2014).
18. Saeed, A., Dullaart, R. P. F., Schreuder, T. C. M. A., Blokzijl, H. & Faber, K. N. Disturbed Vitamin A Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Nutrients* **10**, <https://doi.org/10.3390/nu10010029> (2018).
19. D'Ambrosio, D. N. *et al.* Distinct Populations of Hepatic Stellate Cells in the Mouse Liver Have Different Capacities for Retinoid and Lipid Storage. *Plos One* **6**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024993> (2011).
20. Hellemans, K. *et al.* PPAR beta regulates vitamin A metabolism-related gene expression in hepatic stellate cells undergoing activation. *J. Lip Res.* **44**, 280–295, <https://doi.org/10.1194/jlr.M200376-JLR200> (2003).
21. Itagaki, H., Shimizu, K., Morikawa, S., Ogawa, K. & Ezaki, T. Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine–choline-deficient diet in C57BL/6 mice. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **6**, 2683–2696 (2013).
22. Yang, L. *et al.* Transforming Growth Factor Beta Signaling in Hepatocytes Participates in Steatohepatitis Through Regulation of Cell Death and Lipid Metabolism in Mice. *Hepatology* **59**, 483–495, <https://doi.org/10.1002/hep.26698> (2014).
23. Yamamoto, S. *et al.* Quantitative imaging of fibrotic and morphological changes in liver of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mice by second harmonic generation (SHG) and auto-fluorescence (AF) imaging using two-photon excitation microscopy (TPM). *Biochem. Biophys. Rep.* **8**, 277–283, <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.09.010> (2016).
24. Dranoff, J. A. & Wells, R. G. Portal Fibroblasts: Underappreciated Mediators of Biliary Fibrosis. *Hepatology* **51**, 1438–1444, <https://doi.org/10.1002/hep.23405> (2010).
25. Jophlin, L. L., Koutalos, Y., Chen, C., Shah, V. & Rockey, D. C. Hepatic stellate cells retain retinoid-laden lipid droplets after cellular transdifferentiation into activated myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, G713–G721, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00251.2017> (2018).
26. Kluwe, J. *et al.* Absence of hepatic stellate cell retinoid lipid droplets does not enhance hepatic fibrosis but decreases hepatic carcinogenesis. *Gut* **60**, 1260–1268, <https://doi.org/10.1136/gut.2010.209551> (2011).
27. Tag, C. G. *et al.* Bile Duct Ligation in Mice: Induction of Inflammatory Liver Injury and Fibrosis by Obstructive Cholestasis. *J Vis Exp*, <https://doi.org/10.3791/52438> (2015).
28. Kleiner, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**, 1313–1321, <https://doi.org/10.1002/hep.20701> (2005).

Acknowledgements

We would like to honor the memory and to deeply acknowledge our colleague and friend, Pascal Roux, who initiated the work on spectral analysis and multi-photon microscopy. We are grateful to the Animal Platform and Virginie Mignon from Imaging Platform, UMS 3612 CNRS - US25 Inserm - Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Paris, France. We are also grateful to Nicolas Sorhaindo, Plateforme de Biochimie, CRI, Faculté de Médecine Site Bichat, Paris. We thank Physiogenex SAS for providing us some murine liver sections. We also thank Ottavia Tartagni, Isabelle Torres and Saki Matsumoto for technical assistance during their internship in the UTCBS. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, ANR Fibrother ANR-18-CE18-0005-01 to C.H.). The UtechS PBI (A.D., J.F., and P.R.) is part of the France BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INSB-04-01, “Investments for the future”). Funding for patient’s recruitment (K.C.) was obtained by the Clinical Research Contrat (CRC-Fibrotia).

Author contributions

C.H. and V.E. conceived and designed the experiments. C.H., N.D., A.-M.L., A.D., J.F., P.R., P.B. performed the experiments, C.H., F.C. and I.B. analyzed the animal and human biopsies. K.C. and J.A.-W. set up the clinical trial and analyzed human samples; F.F. and V.R. provided some mice and human biopsies; C.H., N.D., A.D., J.F., C.C., B.H., D.B.R., P.B., V.E. analyzed the data. C.H. and V.E. wrote the manuscript and all authors commented on it.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60615-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.H.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020