



HAL
open science

Contribution des cellules innées lymphoïdes NKp46+ et régulation de leurs fonctions par CD44 au cours de la stéatohépatite métabolique

Manon Bourinet

► **To cite this version:**

Manon Bourinet. Contribution des cellules innées lymphoïdes NKp46+ et régulation de leurs fonctions par CD44 au cours de la stéatohépatite métabolique. Immunologie. Université Côte d'Azur, 2024. Français. NNT: 2024COAZ6008 . tel-04860596

HAL Id: tel-04860596

<https://theses.hal.science/tel-04860596v1>

Submitted on 1 Jan 2025

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

Contribution des cellules innées lymphoïdes
NKp46⁺ et régulation de leurs fonctions par
CD44 au cours de la stéatohépatite métabolique.

Manon BOURINET

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)
Nice – France

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en** Science de la vie
et de la Santé d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Carmelo LUCI, PhD, HDR
Co-encadrée par : Philippe Gual, PhD, DR
Soutenue le : 27 Juin 2024

Devant le jury, composé de :

Dr. Jean-Ehrland Ricci, PhD, DR,
Président du Jury, C3M – Nice.

Dr. Thierry Walzer, PhD, DR,
Rapporteur, CIRI – Lyon.

Dr. Joel Haas, PhD, DR,
Rapporteur, Institut Pasteur – Lille.

Dr. Chantal Desdouets, PhD, DR,
Examinatrice, CRC – Paris.

Dr. Stoyan Ivanov, PhD, CR,
Examineur, LP2M – Nice.

Contribution des cellules innées lymphoïdes NKp46⁺ et régulation de leurs fonctions par CD44 au cours de la stéatohépatite métabolique.

Jury :

Président du jury

Dr. Jean-Ehrland Ricci, PhD, DR, HDR

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, INSERM 1065

Université Côte d'Azur, Nice, France

Rapporteurs

Dr. Thierry Walzer, PhD, DR, HDR

Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111

Université Lyon 1, Lyon, France

Dr. Joel Haas, PhD, DR, HDR

Institut Pasteur de Lille, INSERM UMR1011

Lille, France

Examineurs

Dr. Chantal Desdouets, PhD, DR, HDR

Centre de Recherche les Cordeliers, INSERM Université Paris Cité

Sorbonne Université, Paris.

Dr. Stoyan Ivanov, PhD, CR, HDR

Laboratoire de PhysioMédecine Moléculaire, CNRS UMR7370

Université Côte d'Azur, Nice, France

Invité

Dr. Philippe Gual, PhD, DR, HDR

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, INSERM 1065

Université Côte d'Azur, Nice, France

Résumé

Contribution des cellules innées lymphoïdes NKp46⁺ et régulation de leurs fonctions par CD44 au cours de la stéatohépatite métabolique.

La maladie hépatique stéatotique associée à un dysfonctionnement métabolique (MASLD) est l'une des principales causes de maladies chroniques du foie avec une prévalence mondiale de 33% en 2022. La MASLD regroupe un spectre de lésions hépatiques allant de la stéatose, (accumulation de lipides dans les hépatocytes) vers la stéatohépatite associée au métabolisme (MASH), caractérisée par une inflammation et une mort hépatocytaire. La MASH est la forme évolutive de la maladie qui peut progresser vers des stades plus sévères comme la fibrose/ cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Des acteurs intrahépatiques (cellules immunitaires) et extrahépatiques (tissu adipeux et intestin) contribuent au développement de la MASLD. Actuellement, il n'existe pas/ou peu de thérapies efficaces, ni de biomarqueurs pour traiter ou prévenir la MASLD. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques représente un enjeu majeur pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les cellules innées lymphoïdes (ILC) regroupent un ensemble de 5 populations cellulaires. Parmi elles, les cellules *natural killer* (NK) et les ILC1 auxiliaires représentent l'une des premières lignes de défense de l'organisme. De nombreuses études ont mis en évidence la contribution des ILC dans le développement des maladies métaboliques (obésité, diabète, MASLD) en régulant l'inflammation au sein des tissus cibles : tissu adipeux, foie, intestin. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au ciblage des cellules NK/ILC1 au cours de la MASLD car ces cellules sont impliquées dans la mise en place et/ou la résolution des processus inflammatoires, fibrotiques et tumoraux. Nous avons porté notre attention sur la glycoprotéine de surface CD44 connue pour ses rôles dans les interactions, l'adhésion, la migration et l'activation cellulaire. Notre équipe a mis en évidence un rôle clé de CD44 dans la progression de la MASH en permettant aux macrophages d'acquérir un phénotype pro-inflammatoire. Afin de mieux comprendre le rôle des cellules NK/ILC1 et de CD44 dans les complications hépatiques de l'obésité, nous avons généré un modèle murin d'inactivation spécifique de CD44 au sein des cellules NK et ILC1 (souris NKp46⁺iCre CD44^{flox}). Ainsi, les objectifs de ma thèse ont été d'évaluer : i) l'impact de l'inactivation spécifique de CD44 au sein des ILC NKp46⁺ sur le développement de la MASLD et sur la dynamique des cellules NK /ILC1 dans deux modèles alimentaires inducteurs de MASH/MASLD (régime déficient en choline et méthionine, régime occidental) ; ii) l'impact de l'inactivation spécifique de CD44 sur les fonctions des cellules NK et ILC1; iii) le métabolisme des cellules NK invalidées pour CD44. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une corrélation entre le nombre de cellules NK/ILC1 hépatiques avec la souffrance hépatocytaire au cours de la MASH. De plus, l'inactivation spécifique de CD44 au sein des cellules NK/ILC1 régule leur proportion et conduit à une aggravation de la souffrance hépatique, de l'inflammation et de la fibrose. La gravité de ces lésions est notamment associée à une augmentation de la perméabilité intestinale. L'activation des cellules NK hépatiques déficientes pour CD44 par le LPS induit une augmentation de leur capacité glycolytique, de l'expression/sécrétion de cytokines inflammatoires et favorise également la production de médiateurs inflammatoires par les hépatocytes. Mes travaux de thèse suggèrent que CD44 est un régulateur d'une partie des fonctions des cellules NK hépatiques et son absence au sein de ces cellules contribue au développement de la maladie. Notre étude permet de mieux comprendre la physiopathologie de la MASLD et suggère que le ciblage des fonctions des cellules NK représente un axe d'étude pour le développement d'approches thérapeutiques pour prévenir/traiter les complications hépatiques associées à l'obésité.

Mots clés : Cellules innées lymphoïdes, cellules NK, ILC1, foie, MASH, métabolisme.

Abstract

Contribution of NKp46+ innate lymphoid cells and regulation of their functions by CD44 during metabolic steatohepatitis.

Metabolic dysfunction-associated liver disease (MASLD) is one of the leading causes of chronic liver disease, with a worldwide prevalence of 33% in 2022. MASLD encompasses a spectrum of liver complications ranging from steatosis (accumulation of lipids in hepatocytes) to metabolic-associated steatohepatitis (MASH), characterized by inflammation and hepatocyte death. MASH is the progressive form of the disease, which can progress to more critical stages such as fibrosis/cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Intrahepatic (immune cells) and extrahepatic (adipose tissue and gut) players contribute to the development of MASLD. Currently, there are no/few effective therapies or biomarkers to treat or prevent MASLD. A better understanding of pathophysiological mechanisms represents a huge challenge for the discovery of new therapeutic targets.

Innate lymphoid cells (ILC) comprise a group of 5 cell populations, including *natural killer* (NK) cells and auxiliary ILC1, and represent one of the first line of defence of the organism. Numerous studies have highlighted the contribution of ILCs in the development of metabolic diseases (obesity, diabetes, MASLD) by regulating inflammation in target tissues: adipose tissue, liver, gut. In this context, we were interested in targeting NK cells/ILC1 during MASLD, as these cells are involved in the initiation and/or resolution of inflammatory, fibrotic and tumoral processes. We focused our attention on the surface glycoprotein CD44, known for its roles in cell interactions, adhesion, migration and activation. Our team has identified a key role for CD44 in the progression of MASH, enabling macrophages to acquire a pro-inflammatory phenotype. To better understand the role of NK cells/ILC1 and CD44 in the hepatic complications of obesity, we have generated a mouse model of specific CD44 invalidation within NK cells and ILC1 (NKp46⁺iCreCD44^{flox} mice). Thus, the aims of my thesis were to evaluate: i) the impact of CD44-specific invalidation within NKp46⁺ ILCs on the development of MASLD and on NK cells/ILC1 dynamics in two dietary models inducing MASH/MASLD (choline and methionine-deficient diet, Western diet); ii) the impact of CD44-specific invalidation on NK cell and ILC1 functions; iii) the metabolism of CD44-invalidated NK cells. The results obtained revealed a correlation between the number of hepatic NK cells/ILC1 and hepatocyte suffering during MASH. In addition, the specific invalidation of CD44 within NK cells/ILC1 regulates their proportion, leading to a worsening of liver injury, inflammation and fibrosis. The severity of these lesions is notably associated with increased intestinal permeability. Activation of CD44-deficient hepatic NK cells by LPS induces an increase in their glycolytic capacity, the expression/secretion of inflammatory cytokines and also promotes the production of inflammatory mediators by hepatocytes. My thesis work suggests that CD44 is a regulator of some functions of hepatic NK cells, and its absence within these cells contributes to the development of the disease. Our study provides a better understanding of the pathophysiology of MASLD and suggests that targeting NK cell functions represents a line of investigation for the development of therapeutic approaches to prevent/treat obesity-associated liver complications.

Key words: Innate Lymphoid Cells, NK cells, ILC1, liver, MASH, metabolism.

REMERCIEMENTS

Je remercie l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci au **Dr Thierry Walzer** et au **Dr Joel Haas** pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant d'évaluer mon mémoire en tant que rapporteurs. Merci au **Dr Chantal Desdouets** et au **Dr Stoyan Ivanov** d'avoir accepté d'être les examinateurs de ce projet. Enfin, merci au **Dr Jean-Ehrland Ricci**, qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

J'ai mis du temps à commencer à écrire ces remerciements car pour moi cela signifiait la fin de mes 5 années au sein de l'équipe 8. J'ai donc dû accepter qu'un chapitre de ma vie est en train de se terminer pour laisser la place à un nouveau départ.

De manière évidente la première personne que je souhaiterais remercier c'est toi **Carmelo**. Je te remercie de m'avoir donné ma chance en tant qu'ingénieure d'études il y a maintenant 5 ans, mais également de m'avoir fait suffisamment confiance pour me laisser continuer en thèse. Grâce à toi j'ai eu l'opportunité de vivre ma thèse dans les meilleures conditions et de manière sereine. Je te remercie pour ta bienveillance, ta gentillesse, ton écoute, ton soutien, ta sincérité mais aussi ta confiance, que tu m'as donnée les yeux fermés. Tous ces éléments que tu m'as apportés m'ont permis de m'épanouir au sein de l'équipe, mais également dans la réalisation de notre projet. Tu m'as également permis de grandir et d'évoluer en tant que personne. Tu as été pour moi un excellent directeur de thèse et pour toutes ces choses, je t'en remercie. Surtout garde cette incroyable humanité dont tu fais preuve, car c'est une grande qualité qui se fait rare dans ce domaine. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Je souhaiterais également vous remercier **Philippe**. Dans un premier temps car vous représentez le directeur de cette très belle équipe et dans un second temps pour le soutien que vous m'avez apporté au cours de ma thèse. Merci pour votre investissement dans mon projet, pour vos conseils et votre aide, pour ce partage scientifique et surtout pour la positivité dont vous faites toujours preuve et qui permet de continuer à croire en ce que l'on fait.

Elodie, je voudrais également te remercier car c'est toi qui a commencé ce projet au côté de Carmelo et qui m'a suffisamment formé afin de pouvoir reprendre le flambeau par la suite. Quand la papier sortira j'espère que tu seras fière de ce que l'on a réalisé.

Comment parler de l'équipe 8 sans parler de vous **Débo et Stéfie** !! C'est simple, vous représentez les piliers de cette équipe. Bien que très différentes l'une de l'autre, vous avez toutes deux fait preuve d'une incroyable bienveillance envers moi pendant ces 5 années à vos côtés.

Merci pour vos oreilles attentives, vos paroles rassurantes et vos encouragements lorsque j'ai pu faire face à des moments de doute. Merci également pour votre soutien et vos conseils « techniques » qui m'ont grandement permis d'avancer dans mon projet. Vous êtes réellement essentielles à cette équipe et je pense que vous n'imaginez pas tout ce que vous apportez aux étudiants/doctorants qui passent par là. Je pense qu'on vous l'a déjà dit, mais vous êtes un peu nos mamans de l'équipe 8.

Fred, ça a été un plaisir de partager avec toi ces 2 années ½ au sein de l'équipe. Merci pour ta disponibilité et tes conseils. Je te remercie également de m'avoir accompagné et soutenu lors du congrès EMBO à Marseille. J'ai apprécié passer ces quelques jours avec toi là-bas. Merci également pour les bons desserts que tu nous as préparé lors de tes anniversaires, je m'en souviendrai !! Je te souhaite le meilleur pour la suite, aussi bien au niveau personnel avec Céline, que professionnel (au sein de l'équipe 8 ou non).

Merci également à toi **Coline** pour l'aide que tu m'as apportée au cours de ces derniers mois. Tu as permis au projet de continuer d'avancer pendant l'écriture de ce manuscrit. Je te souhaite une bonne continuation pour la suite de ton cursus.

Je voudrais également adresser mes remerciements à tous nos cliniciens. Merci à **Albert**, **Rodolphe** et **Guillaume**, de prendre le temps de venir écouter nos présentations et nos résultats tous les Lundi malgré leur emploi du temps bien chargé. Merci pour le partage de leur expertise qui a été pour moi très enrichissant.

Pour clôturer mes remerciements au sein de l'équipe 8, c'est bien évidemment par toi, **Axelle**, que je voulais terminer. Pour moi tu es passée de ma stagiaire de Master 1, à l'une de mes meilleures amies. En seulement 3 ans tu as véritablement obtenu une place importante dans ma vie. Je pense que ces trois dernières années de thèse sans toi auraient été bien différentes. Tu as grandement participé au bon déroulement et à l'équilibre de ma thèse. Tu as été d'un soutien irremplaçable pour moi que ce soit au niveau personnel ou professionnel. Je te remercie donc indéfiniment pour ton écoute, tes conseils, ta gentillesse, ton soutien et surtout ton amitié. Mais bien sûr, je te remercie aussi pour nos goûters (Fenocchio, Ballanger et Starbucks vont voir leur chiffre d'affaire chuter sans nous), nos sessions shopping, nos plages, nos pauses twister les après-midi d'été et enfin nos soirées dansantes à Escobar qui ont clairement fait partie intégrante de mon doctorat 😊 !! Comment ne pas parler aussi de nos petits séjours (Barcelone, Sainte-Maxime, Saint-Tropez, Rome) qui nous ont permis d'oublier durant de courts instants nos thèses. Même si aujourd'hui mon doctorat se termine, je reste sereine sur le fait que ce n'est pas le cas de notre amitié. Tu devras terminer ta thèse sans moi et même si je sais que tu le redoutes, saches que de mon côté je n'ai aucun doute sur le fait que tout va très bien se passer pour toi.

Tu as énormément de qualités et de capacités en toi, il faut juste que tu en prennes conscience et surtout que tu te fasses confiance. En trois ans je t'ai déjà vu évoluer de manière impressionnante et je suis extrêmement fière de toi. Je terminerai ce paragraphe en te remerciant une nouvelle fois pour tout ce que notre amitié m'a apporté et tu le sais que dans tous les cas je serai toujours là pour toi.

Inès ! C'est en 2022 lors de la fête de la science que j'ai eu le plaisir de te découvrir et d'apprendre à te connaître. Tu as été une très belle découverte et je suis très contente de t'avoir eu à mes côtés pour mes 2 dernières années de thèse. Tu es une personne d'une incroyable gentillesse et d'une grande sincérité. Je me suis beaucoup retrouvée en toi lors de nos discussions et je pense que ce sont ces points communs qui nous ont permis de si bien nous entendre et de devenir amies. Tu es également sur la fin de thèse, donc accroche toi il ne te reste plus grand-chose et ne t'inquiète pas tout va bien se passer. Je voulais aussi te remercier du fond du cœur pour ces moments que l'on a partagés qui ont été d'une très grande importance pour moi. Merci pour ton soutien, tes encouragements, et de toujours avoir su trouver les bons mots. Je te souhaite le meilleur pour la suite aussi bien dans ta vie personnelle que professionnelle et dans tous les cas, on reste en contact.

Ma **Saloua**. Comme tu me l'as écrit dans tes remerciements, on a commencé notre thèse la même année, mais on ne s'est rapproché que bien plus tard.. et c'est bien dommage (je suis d'accord avec toi). Je voulais te remercier car tu as été un vrai petit rayon de soleil pour moi. Ton sourire, ton rire et ton humour ont été une vraie bouffée d'air frais. Merci également pour ton soutien tout au long de l'écriture de ce manuscrit. Je voudrais te souhaiter le meilleur pour la suite.. mais je pense qu'avec deux petits garçons adorables, ton mari et l'obtention de ton doctorat, tu as déjà tout ce qu'il faut pour être heureuse et j'espère que ton bonheur perdurera le plus longtemps possible, car tu le mérites.

Je voulais également vous remercier **Raph** et **Brice**. **Raph** pour nous avoir tenu compagnie avec Fred au cours de ton stage de Master 2. Par ta présence, le bureau paraissait moins vide et nos Vendredi après-midi beaucoup moins ennuyeux (PS : tu aurais dû rester dans l'équipe 8) 😊. Merci également pour les bons moments que l'on a partagés et en particulier nos repas du midi avec Inès et Axou. Surtout, continue le chant et la comédie musicale car c'était vraiment top !! **Brice**, je te remercie pour ta bonne humeur, ta joie de vivre et ton soutien. Tu as toujours

eu des mots réconfortants à bienveillants à mon égard et je t'en remercie. Enfin je voulais vous souhaiter à tous les deux bon courage pour la fin de vos thèses. Je suis sûre que vous allez gérer.

Merci également à toi **Pierre**. Je suis arrivée dans l'équipe en Septembre 2019 et toi tu passais ta thèse en Décembre 2019, ce qui résume le temps passé ensemble au sein de l'équipe à seulement 4 mois. Pourtant, même après ton départ tu as continué d'être un vrai soutien pour moi. Je te remercie pour ta disponibilité, ton écoute, tes conseils et ta gentillesse. C'était agréable de savoir que lorsque j'étais un peu perdue dans mes projets ou avec la recherche en générale, je pouvais compter sur toi. Je te souhaite sincèrement le meilleur pour la suite car tu le mérites et j'espère que l'on restera en contact.

Et enfin je vais clôturer ces remerciements en m'adressant à ma famille et à mes proches.

Maman, Papa, lorsque j'étais en terminale je vous ai dit que je ne voulais pas faire de longues études et qu'un DUT me conviendrait... et pourtant me voilà, à écrire ces lignes 10 ans après au vu de l'obtention de mon Doctorat. Je voulais donc vous remercier de m'avoir permis de réaliser toutes ces études et d'avoir effectué tous ces déménagements à Lille, à Orléans, puis enfin à Nice. Merci pour votre soutien, votre confiance et votre amour. Je pense que vous pouvez être fiers de vous, puisque (si tout se passe bien) vous aurez bientôt deux filles « Docteurs ».

Maman, je tenais également à te remercier de t'être consacrée intégralement à Laura et à moi pendant notre enfance et de prendre encore si bien soin de nous et de notre famille.

Papa, je te remercie pour le confort de vie que tu nous a donné et d'avoir veillé à mon épanouissement.

Encore merci pour tout, je vous aime.

Laura, ma grande sœur, merci de toujours avoir été de mon côté, merci pour ton soutien et de toujours avoir cru en moi. Je pense que tu es née pour briller et réussir tout ce que tu entreprends, grâce à cette incroyable intelligence que tu as et qui a fait de toi un incroyable modèle ainsi qu'une source d'inspiration (même si j'ai bien compris qu'il était impossible d'atteindre ton niveau). Merci pour tout lolo !!

Léa, je te remercie pour ton soutien et l'amitié que tu as envers moi depuis toujours. Merci, pour ton écoute, ta disponibilité, ta gentillesse, ta bienveillance, ta bonne humeur, ton sourire

et tes conseils. Même depuis la Suisse, tu arrives à me transmettre ta positivité et tes bonnes ondes. Merci de croire en moi et d'arriver à toujours trouver les bons mots pour me remotiver. En clair, merci d'avoir joué le rôle de meilleure amie à la perfection même à distance, car tu as été pour moi d'un grand soutien au cours de mon doctorat. Je suis contente que Julia soit à tes côtés, et je vous souhaite le meilleur à toutes les deux.

Merci également à ma **Nashou** de m'avoir si bien tenu compagnie tout au long de ce doctorat ainsi que pendant l'écriture de ce manuscrit et qui m'a bien diverti avec tous ces quarts d'heure de folie.

Et enfin, je terminerai par toi **Dorian**. Je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté ces dernières années. Merci d'être revenu à Nice pour être avec moi, merci de partager mon quotidien, merci de me faire rire, merci de croire en moi, merci de m'avoir épaulé tout au long de mon doctorat, merci pour ton incroyable bienveillance, ton extrême gentillesse et pour tout l'amour que tu m'apportes. Tu as été mon pilier ces 3 dernières années et j'ai hâte d'ouvrir le prochain chapitre de notre vie, en commençant par ce voyage de 3 mois en Asie qui me tarde de réaliser à tes côtés. Tu es une personne extraordinaire et j'ai une chance immense que tu fasses partie de ma vie. Merci pour tout, je t'aime.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
TABLE DES FIGURES	4
TABLE DES TABLEAUX	6
ABBREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION	11
I- Le foie et l'environnement hépatique	11
a) Anatomie et fonctions.....	11
b) Environnement cellulaire et immunité du foie.....	13
i. Hépatocytes	14
ii. Cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSEC)	17
iii. Cellules stellaires hépatiques (HSC)	18
iv. Cellules de Kupffer (KC).....	19
v. Cellules dendritiques (DC)	20
vi. Cellules T non conventionnelles.....	21
▪ <i>Les lymphocytes T $\gamma\delta$</i>	21
▪ <i>Les lymphocytes T invariants associés aux muqueuses (MAIT)</i>	22
▪ <i>Les cellules iNKT (NKT)</i>	23
▪ <i>Les cellules innées lymphoïdes (ILC)</i>	24
II- Maladies chroniques associées à l'obésité : MASLD.....	26
a) Définition et diagnostic de la MASLD	26
i. Définition.....	26
ii. Diagnostic.....	27
b) Stéatose	29
c) La MASH	31
i. Facteurs extrahépatiques dans la MASH.....	32
▪ <i>Le tissu adipeux (AT)</i>	32
▪ <i>L'axe intestin-foie</i>	34
ii. Facteurs/acteurs intrahépatiques dans la MASH	37
▪ <i>La Lipotoxicité</i>	37
▪ <i>Les hépatocytes</i>	38
▪ <i>Les LSEC</i>	39
▪ <i>Les cellules de Kupffer et les MoMF</i>	40

▪	<i>Les neutrophiles</i>	43
▪	<i>Les cellules dendritiques</i>	45
▪	<i>Les lymphocytes T et lymphocytes B</i>	46
▪	<i>Les lymphocytes T non conventionnels</i>	50
d)	De la fibrose à la cirrhose	51
e)	Le Carcinome hépatocellulaire (CHC)	53
f)	Synthèse des mécanismes physiopathologiques de la MASLD	54
g)	Modèles expérimentaux	56
i.	Les Modèles diététiques	56
▪	<i>Le régime riche en graisses (High Fat Diet HFD)</i>	56
▪	<i>Le régime riche en fructose</i>	57
▪	<i>Le régime enrichi en cholestérol et cholate</i>	57
▪	<i>Le régime déficience en méthionine et choline (MCDD)</i>	58
▪	<i>Le régime alimentaire CDAA (choline-déficient L-amino-défini)</i>	58
ii.	Modèles génétiques	59
▪	<i>Favoriser la synthèse des graisses</i>	59
▪	<i>Inhibition de l'oxydation des lipides</i>	60
▪	<i>Entraver le transport des graisses</i>	61
iii.	Modèles chimiques	61
h)	Traitements pharmacologiques	62
III-	CD44 : un acteur de la régulation métabolique et des fonctions immunitaires	66
a)	Structure	66
b)	Fonctions	67
i.	Généralité et modes d'action	67
ii.	CD44 et lymphocytes T	68
iii.	CD44 et macrophages.....	72
c)	Son rôle dans les cancers et les maladies métaboliques	73
i.	Cancer.....	73
ii.	Maladies Métaboliques.....	75
IV-	Cellules innées lymphoïdes : fonctions et métabolisme	78
a)	Description générale	78
b)	Les 5 sous-populations d'ILC	82
i.	Les ILC2	82
ii.	Les ILC3	83
iii.	Les LTi.....	84
iv.	Les ILC1	84

v.	Les cellules NK	88
▪	<i>La réponse cytotoxique par relargage de granules lytiques.....</i>	88
▪	<i>La réponse cytotoxique médiée par les récepteurs de mort</i>	89
▪	<i>La sécrétion cytokinique.....</i>	90
▪	<i>Fonctions effectrices et métabolisme des cellules NK.....</i>	90
c)	Rôle des cellules NK/ILC1 dans les MASLD	96
i.	Cellules NK et ILC1 dans le tissu adipeux au cours de la MASLD.....	96
ii.	Cellules NK et ILC1 dans l'intestin au cours de la MASLD.....	97
iii.	Cellules NK et ILC1 dans le foie au cours de la MASH	98
iv.	Cellules NK et ILC1 au cours de la fibrose hépatique	99
v.	Cellules NK et ILC1 dans le CHC.....	100
	HYPOTHESES ET OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	103
	RESULTATS PARTIE I.....	106
	<i>Résumé article</i>	106
	RESULTATS PARTIE II	110
	1- <i>Métabolisme et fonctions effectrices des cellules NK invalidées pour CD44</i>	110
	2- <i>Etude de la capacité de prolifération et de recrutement des cellules NK invalidées pour CD44 après 4 semaines de MCDD.</i>	119
	3- <i>La déplétion des cellules NK dans un modèle murin de stéatohépatite semblerait diminuer les complications hépatiques.</i>	121
	RESULTATS PARTIE III.....	124
	<i>Résumé revue.....</i>	124
	DISCUSSION.....	125
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	143
	REFERENCES	146
	ANNEXES.....	185

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique de l'architecture hépatique	12
Figure 2. Diagramme arborescent de la fréquence approximative des cellules résidentes du foie et de leur fonction dans l'immunité hépatique.....	25
Figure 3. Spectre de la maladie hépatique stéatotique associée à un dysfonctionnement métabolique (MASLD) : stades et progression d'un foie sain à un carcinome hépatocellulaire.....	27
Figure 4. La pathogenèse de la stéatose hépatique.....	31
Figure 5. L'inflammation du tissu adipeux favorise la progression de la MASH.	33
Figure 6. Représentation schématique de l'axe intestin-foie au cours de la MASLD.....	36
Figure 7. Schéma récapitulatif des différents acteurs intrahépatiques impliqués dans la mise en place de l'inflammation hépatique au cours de la MASH et de la progression de la MASLD.	37
Figure 8. Mécanisme d'activation des cellules stellaires hépatiques et mise en place de la fibrose hépatique.	52
Figure 9. Schéma récapitulatif des différents mécanismes intra- et extra- hépatiques de la physiopathologie de la MASLD.	55
Figure 10. Schéma récapitulatif des différentes molécules en essais pré-cliniques et cliniques pour traiter la MASLD. (Page suivante)	62
Figure 11. Représentation schématique de la protéine CD44s et CD44v ainsi que de la structure de son gène.....	67
Figure 12. Rôle de CD44 dans les mécanismes cellulaires et moléculaires de « rolling », d'adhésion, de « crawling » et de transmigration des lymphocytes T.	71
Figure 13. Principales contributions des sous-populations d'ILC à l'immunité.....	78
Figure 14. Développement des cellules innées lymphoïdes.	80
Figure 15. Les ILC1 et les cellules NK conventionnelles (cNK) expriment des récepteurs communs et distincts à la surface des cellules.....	86
Figure 16. Fonctions effectrices et métabolisme des cellules NK.	95
Figure 17. Rôles des cellules NK et des ILC1 au cours de la MASLD.	102
Figure 18. Métabolisme des cellules NK hépatiques isolées de souris Littermate ou invalidées spécifiquement pour CD44, après stimulation cytokinique ou activation du récepteur NK1.1.....	113

Figure 19. Etude des fonctions effectrices des cellules NK hépatiques isolées de souris Littermate ou invalidées spécifiquement pour CD44, après stimulation cytokinique (IL12/IL18) ou activation du récepteur NK1.1.....	115
Figure 20. Etude du métabolisme, des fonctions effectrices, de la capacité de prolifération et de recrutement des cellules NK invalidées ou non pour CD44 après 4 semaines de MCDD	117
Figure 21. La déplétion des cellules NK dans un modèle de stéatohépatite (MCDD) améliore les complications hépatiques.....	123
Figure 22. Schéma bilan de mon projet de thèse.	145

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Tests non invasifs de prédiction de la fibrose hépatique et de la MASH-fibrosante et critères d'évaluation du NAFLD Activity Score (NAS).....	29
Tableau 2. Récapitulatif des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 au cours de la MASLD.	49
Tableau 3. Expression de CD44 dans les différents types de cancers.	75

ABBREVIATIONS

A

5-ASA	5-Aminosalicylic acid
ADNmt	ADN mitochondrial
AHR	Aryl hydrocarbon receptor
ALT	Alanine aminotransférase
AMPS	Antimicrobial protein // Protéine antimicrobienne
AOX	Acyl-coenzyme A oxidase
ApoE	Apolipoprotéine-E
α -SMA	Alpha smooth muscle actin
AST	Aspartate aminotransférase
ATF6	Activating transcription factor 6

B

BAFF	B-cell activating Factor // Facteur d'activation des cellules B
BAT	Brown adipose tissue // Tissu adipeux brun
BMP4	protéine morphologique osseuse 4

C

CCL4	Tétrachlorure de carbone
CD	Régime contrôle
CDA A	Choline-deficient L-amino defined
Cellules NK	Cellules tueuses naturelles
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CMH-I // CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I // de classe II
CMS	Navette Citrate Malate
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CSC	Cellules souches cancéreuses

D

DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DC	Dendritic cells / Cellules dendritiques
DEN	Diéthylnitrosamine
Dox	Doxycycline
DT2	Diabète de type 2

E

eNOS	Endothelial nitric oxide synthase // Oxyde nitrique synthase endothéliale
Eomes	Eomésodermine

F

FAO Fatty acid oxidation // Oxydation des acides gras
FXR Récepteur Farnésoïde X

G

GM-CSF Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GR Globules rouges
GzmB Granzyme B

H

HA Hyaluronic Acid // Acide Hyaluronique
HBeAg Protéine virale de l'hépatite B
HDL High density lipoprotein // lipoprotéine de haute densité
HFD High fat diet // Régime riche en gras
HMW-HA High Molecular Weight Hyaluronic Acid // Acide hyaluronique de haut poids moléculaire.
HSC Hepatic stellate cells // Cellules stellaires hépatiques

I

IgA Immunoglobulines A
ILC Innate lymphoid cells // Cellules innées lymphoïdes
iNKT invariant natural killer T cells
IRE1 Inositol-requiring enzyme 1

J

JAM Junctional adhesion molecule

K

KC Kupffer Cells // Cellules de Kupffer

L

LDL Low density lipoprotein // lipoprotéine de basse densité
LPS Lipopolysaccharides
LSEC Liver sinusoidal endothelial cells / Cellules endothéliales sinusoidales du foie
LT Lymphocytes T
LTi Lymphoid tissue inducer cells // Cellules inductrices de tissu lymphocytaire

M

MAIT Mucosal-associated invariant T cell // Lymphocytes T invariants associés aux muqueuses
MASH Metabolic dysfunction associated steatohepatitis
MASLD Metabolic dysfunction-Associated steatotic Liver Disease // Maladie hépatique stéatotiques associée à un dysfonctionnement métabolique

MCDD	Methionine choline deficient diet // régime déficient en méthionine et choline
Mfn2	Mitochondrial protein mitofusion 2
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MoMF	Macrophages dérivés de monocytes de la moelle osseuse
MPO	Myéloperoxydase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
N	
NCR	Natural Cytotoxic Receptor
NET	Neutrophil Extracellular Trap // Pièges extracellulaires de neutrophiles
O	
OPN	Ostéopontine
OXPHOS	Oxidative Phosphorylation // Phosphorylation Oxydation
P	
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PERK	Protein kinase RNA-like ER Kinase
PPAR	Peroxisome Proliferator-activated receptor
PPAR α	Proliférateurs du peroxydome- α
PRR	Pattern recognition receptor
PTEN	Homologue de la phosphatase et de la tensine
R	
RE	Reticulum endoplasmique
ROS	Reactive Oxygen Species
S	
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
STHD	Steatohepatitis-inducing High fat diet
T	
TA	Tissu adipeux
TCA	cycle de l'acide tricarboxylique (Cycle de Krebs)
TCR	T cell receptor // Récepteur des lymphocytes T
TG	triglycérides
THR- β	Thyroid hormone receptor B
TIMP	Inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinase
TLR	Toll-like receptor
TME	Microenvironnement tumoral
TNFR2	Récepteur 2 du TNF

U

UPR	Unfolded protein response
VE	Vésicules extracellulaires
VHB	Virus de l'hépatite B

V

VHC	Virus de l'hépatite C
VLDL	Vésicules lipido-protéiques de transport

W

WAT	Wight adipose tissue // Tissu adipeux blanc
WT	Wild-Type

Z

ZO-1	Zonula Occludens-1
------	--------------------

INTRODUCTION

I- Le foie et l'environnement hépatique

a) Anatomie et fonctions

Le foie est l'organe glandulaire le plus grand (28cm de large et 16cm de haut) et le plus lourd (1,5kg) du corps humain et se situe en haut de la cavité abdominale. Chez la souris le foie mesure 1,5 à 2cm de large et 1cm de haut et pèse 1,5g. Le foie est extrêmement vascularisé, recevant 25% de l'efflux cardiaque au repos, et se décompose en quatre lobes : le lobe hépatique droit, le lobe hépatique gauche, le lobe carré et le lobe caudé. L'unité fonctionnelle du foie est le lobule.

Les lobules hépatiques sont caractérisés par des collections d'hépatocytes de forme hexagonale dont le centre est une veine centrale (**Figure 1**). A l'intérieur des lobules, les hépatocytes sont disposés en cordons, et entre les cordons se trouve un espace vasculaire avec un endothélium fenêtré mince et une membrane discontinue appelée sinusoïde. Ces sinusoides contiennent les macrophages résidents du foie (cellules de Kupffer) et les cellules étoilées (cellules stellaires hépatiques). Au sommet de l'hexagone on retrouve organisé en triade : une branche du canal biliaire, une branche de la veine porte et une branche de l'artère hépatique, formant à eux trois ce que l'on appelle une triade portale. Le sang s'écoule à travers le lobule depuis les branches de la veine porte et de l'artère hépatique jusqu'à la veine centrale (Juza and Pauli, 2014; Vernon et al., 2024).

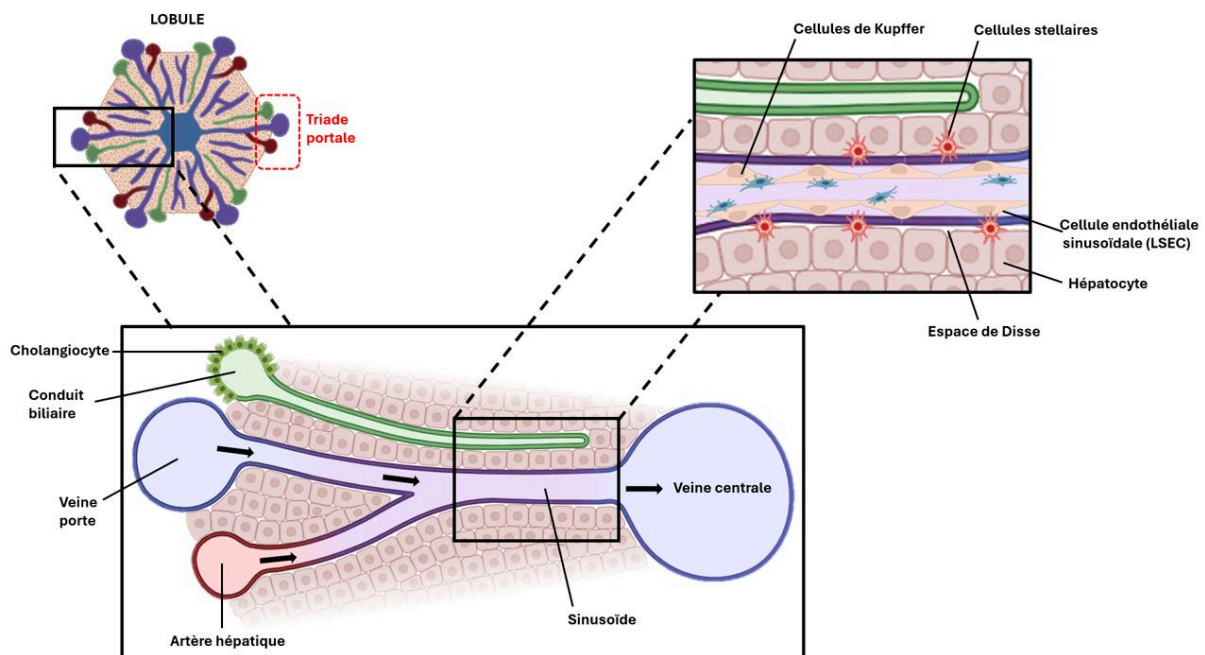


Figure 1. Représentation schématique de l'architecture hépatique

Le lobule hexagonal classique constitue l'unité anatomique du foie. Le parenchyme du lobule est essentiellement formé d'hépatocytes qui sont répartis le long des sinusoïdes. La triade portale, formée de l'artère hépatique, la veine porte, et le canal biliaire, transporte l'apport sanguin vers le centroïde du lobule où il est recueilli par la veine centrale. A l'intérieur des sinusoïdes les cellules de Kupffer sont situées à proximité des cellules endothéliales sinusoïdales, tandis que les cellules stellaires se logent au niveau de l'espace de Disse.

(Adaptée de Boninsegna et al., 2023)

Le foie est principalement connu pour ses fonctions endocrines et exocrines. Ses rôles endocrines reposent sur le stockage et la répartition des nutriments issus de la digestion (contrôle glycémique par l'intermédiaire de l'insuline et du glucagon), la synthèse de la plupart des protéines du sang (protéines plasmatiques dont l'albumine, facteurs de coagulation et protéines du complément) et la sécrétion de vésicules lipido-protéiques de transport (VLDL), de métabolites et d'hépatokines (activine-E, ANGPTL3/4/6/8, FGF21...). Les hépatokines sont des facteurs dérivés du foie qui peuvent signaler et communiquer avec des tissus éloignés (cerveau, tissu adipeux, muscle) afin d'assurer une régulation hépatique de l'homéostasie énergétique (Jensen-Cody and Potthoff, 2020). L'activine-E par exemple augmente la dépense énergétique et la sensibilité à l'insuline grâce à l'activation des adipocytes bruns et beiges, tandis que le FGF21 régule l'homéostasie énergétique en augmentant la dépense énergétique, diminuant les triglycérides plasmatiques et la consommation de sucre (Andersen et al., 2018; Hotta et al., 2009). Ses rôles exocrines quant à eux, s'illustrent à travers la dégradation de substances toxiques (en les traitant et métabolisant à l'intérieur du lobule), l'excrétion des sels

biliaires et enfin la conjugaison (dans les hépatocytes par l'enzyme UGT1A1) et l'excrétion de la bilirubine dans l'intestin grêle (Kalra et al., 2024; Vernon et al., 2024). La bilirubine est un composant de la voie catabolique de l'hème et est essentielle à la fonction hépatique notamment pour son implication dans la réduction de l'accumulation des graisses hépatiques. En effet, la bilirubine va favoriser l'activité transcriptionnelle du récepteur activé par les proliférateurs du peroxydase- α (PPAR α) afin d'augmenter les gènes de la combustion des graisses. Une fois excrétée dans l'intestin, elle est convertie par les microbes en urobilinoïdes, qui est soit réduite en un pigment prédominant dans les selles (la stercobiline) ou soit réabsorbée dans la circulation portale (Hamoud et al., 2018).

Au-delà de ces différentes fonctions, le foie est directement impliqué dans le processus de défense de notre immunité. En effet, les cellules hépatiques (hépatocytes, cellules de Kupffer, cellules stellaires) combinées à d'autres cellules immunitaires font de cet organe un tissu immunitaire clé de première ligne.

b) Environnement cellulaire et immunité du foie

La localisation du foie dans l'organisme en fait à la fois une arme redoutable dans la détection des agents pathogènes qui pénètrent dans le corps par l'intestin, mais également dans l'élimination des bactéries, des virus et des macromolécules. Par « défaut » le foie est un organe immunotolérant (tolérance des antigènes alimentaires). Cependant dans certaines conditions, le foie doit mettre en place une réponse immunitaire robuste et rapide. Les infections virales chroniques (VHB : virus de l'hépatite B ou VHC : virus de l'hépatite C), les maladies alcooliques du foie, la stéatohépatite associée à un dysfonctionnement métabolique (MASH), ainsi que les maladies hépatiques auto-immunes sont les principales étiologies des maladies hépatiques chroniques (Aigner et al., 2015; Devarbhavi et al., 2023). Ces maladies hépatiques chroniques sont caractérisées par des lésions hépatocytaires et une inflammation qui sur le long terme peuvent mener au développement d'une fibrose et d'une cirrhose et finalement à un cancer du foie. C'est pourquoi l'équilibre entre tolérance et immunité est un élément essentiel pour la fonction hépatique. En effet, une inflammation excessive en l'absence d'infection entraîne des lésions hépatiques stériles et des lésions tissulaires. Une immunité insuffisante, quant à elle, va favoriser une infection chronique et le développement d'un cancer. Ainsi, les interactions dynamiques entre les nombreuses populations de cellules non-immunes et immunitaires du foie sont essentielles au maintien de cet équilibre tolérance/immunité. (Kubes and Jenne, 2018) (**Figure 2**).

i. Hépatocytes

Les hépatocytes sont les principales cellules parenchymateuses du foie et représentent en proportion 70 à 80% des cellules totales de cet organe. Les hépatocytes sont impliqués dans la synthèse et le stockage des protéines, la transformation des glucides, la synthèse du cholestérol, des sels biliaires et des phospholipides, la détoxification et l'excrétion de substances exogènes/endogènes et enfin l'initiation de la formation et de la sécrétion de bile. Les hépatocytes contiennent une abondance d'organites cellulaires associés aux fonctions métaboliques et sécrétoires précédemment abordées. Les organites impliqués dans les fonctions sécrétoires sont le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. Les hépatocytes contiennent également des mitochondries qui fournissent de l'énergie afin de maintenir les fonctions métaboliques du foie (métabolisme des glucides, lipides, détoxification...) (Schulze et al., 2019). Par ailleurs, il est également important de prendre en considération leur rôle clé dans le maintien de l'homéostasie hépatique par l'intermédiaire de l'activation de cellules immunitaires (Gong et al., 2023). Les concepts traditionnels ont souvent décrits les hépatocytes comme les cibles d'agressions (DAMPs et PAMPs) entraînant alors leur mort et en faisant une caractéristique pathologique importante dans les maladies du foie (Rinella, 2015). Les DAMPs (Damage-associated molecular patterns) sont des molécules de danger endogènes qui sont libérées par les cellules endommagées ou mourantes et activent le système immunitaire inné en interagissant avec les récepteurs de reconnaissance de formes (PRR) (Roh and Sohn, 2018). Les PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern) sont des motifs moléculaires associés à des agents pathogènes, tels que les bactéries et les virus, qui fournissent des signatures également reconnues par les PRR (Hewison and Adams, 2024). Plus récemment, le rôle des hépatocytes en tant que moteur de l'inflammation et de la fibrose hépatique prend de plus en plus d'importance (Wree et al., 2019). En effet, les hépatocytes stressés participent à l'inflammation du foie en s'adaptant au microenvironnement et en interagissant avec les populations cellulaires environnantes (Tu et al., 2015). Par ailleurs, les hépatocytes produisent et sécrètent constitutivement une variété de médiateurs (CXCL10, IL-6, CCL2, TNF α , IL-33, MMP-2, TIMP-1) qui jouent un rôle important dans la régulation immunitaire et la fibrose (Seki and Schwabe, 2015; Zhou et al., 2016).

Le réticulum endoplasmique, organite impliqué dans les fonctions sécrétoires des hépatocytes, est le lieu de repliement des protéines sécrétoires et transmembranaires, de la synthèse des lipides ainsi que de l'homéostasie calcique. Lorsqu'une protéine est mal repliée, la réponse UPR

(Unfolded protein response) est activée par trois capteurs transmembranaires : PERK (Protein Kinase RNA-Like ER Kinase), ATF6 (Activating transcription factor 6), IRE1 (Inositol-requiring enzyme 1) afin de résoudre le défaut de repliement de la protéine (Malhi and Kaufman, 2011). Cependant, l'accumulation de protéines mal conformées et l'activation excessive de la réponse UPR conduit à ce que l'on appelle le stress du RE et à la mise en place d'une réponse adaptative. Le stress du RE va alors entraîner l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires (NF- κ B et de JKNs), l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la libération de vésicules extracellulaires inflammatoires qui favorisent l'infiltration des cellules immunitaires (Dasgupta et al., 2020; Li et al., 2015; Malhi and Kaufman, 2011). Par conséquent, le stress du RE est clairement impliqué dans l'inflammation hépatique exacerbant les maladies du foie (Gong et al., 2023).

Les mitochondries sont des éléments clés impliqués dans le métabolisme des lipides et dans la production d'énergie. Dans des conditions saines, un contrôle de la qualité mitochondriale permet aux mitochondries de maintenir une morphologie et une homéostasie normales (fusion et fission mitochondriale, biogenèse et mitophagie) (Mansouri et al., 2018). Dans certaines conditions (obésité, consommation excessive d'alcool, infections chroniques par les virus de l'hépatite B et V...), la sollicitation excessive des mitochondries engendre l'altération de la respiration mitochondriale des hépatocytes et une libération excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Mansouri et al., 2018). Ces ROS induisent alors la synthèse de cytokines qui amplifient une réaction inflammatoire en cascade, l'apoptose et la nécrose des hépatocytes. Par ailleurs, la présence d'ADN mitochondrial (ADNmt) dans le cytosol ou la circulation va déclencher des réponses pro-inflammatoires avec l'activation de l'inflammasome NLRP3 et des réponses de type 1 à l'IFN, dépendantes de la voie cGAS-STING (Youle, 2019). L'ADNmt libéré par les mitochondries hépatocytaires est également impliqué dans l'activation fibrogénique des cellules stellaires hépatiques (HSC) et dans l'inflammation en se liant au TLR9 endosomale des cellules de Kupffer (An et al., 2020; Garcia-Martinez et al., 2016.). Plus récemment, il a été mis en évidence que la déficience de la protéine Mfn2 (Mitochondrial protein mitofusion 2), impliquée dans la connexion entre les membranes du RE et de la mitochondrie, empêche le transfert de la phosphatidylsérine du RE vers la mitochondrie, ce qui entraîne une inflammation du foie suite au blocage de la synthèse des phospholipides et la mise en place d'un stress du RE (Hernández-Alvarez et al., 2019; Hou et al., 2021).

L'autophagie, de manière générale (macroautophagie, microautophagie et autophagie médiée par des protéines chaperonnes), est un processus lysosomal catabolique impliqué dans l'élimination des protéines endommagées, des gouttelettes lipidiques et des organites dysfonctionnels, ce qui fait de ce mécanisme un régulateur clé des hépatocytes. Les facteurs tels que les toxines, la stéatose ou le vieillissement sont connus pour diminuer l'autophagie des hépatocytes mais également des macrophages (Amir et al., 2013; K. Liu et al., 2015). La diminution de l'autophagie hépatocytaire amplifie l'apoptose par le mécanisme d'augmentation du clivage de la caspase 8 et rend les hépatocytes beaucoup plus sensibles à l'IL-1 β ou au TNF α engendrant ainsi une nécrose cellulaire et une inflammation du foie (Shen et al., 2020).

Suite à des lésions hépatiques, les hépatocytes stressés libèrent des médiateurs impliqués dans le dialogue entre les hépatocytes et les populations cellulaires environnantes, faisant ainsi des hépatocytes des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) non professionnelles résidentes du foie. Ce statut qui leur ait conféré peut donc induire un biais en faveur de la tolérance immunitaire. Les vésicules extracellulaires (VE) dérivés d'hépatocytes font parties de ces médiateurs qui ont un rôle clé dans l'inflammation du foie. En effet, la libération des VE (enrichies en ADNmt, miR-3075, miR-192-5p, céramide, CXCL10...), induite par l'activation lipotoxique des hépatocytes, entraîne le recrutement ainsi que l'activation de la polarisation inflammatoire des macrophages (Dasgupta et al., 2020; Garcia-Martinez et al., 2016.; Ibrahim et al., 2016; Ji et al., 2021; Momen-Heravi et al., 2015). Par ailleurs, les hépatocytes sont également capables de sécréter directement diverses cytokines et chimiokines impliquées dans l'inflammation hépatique telles que l'IL-6, IL-11, IL-32, IL-33, CXCL1, CCL2 et l'IL-8. Ces diverses cytokines/chimiokines se voient notamment impliquées dans le recrutement des neutrophiles et des macrophages ou encore dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β ou le TNF α (Dong et al., 2021; Giraldez et al., 2021; Joshi-Barve et al., 2007; Moschen et al., 2011; Obstfeld et al., 2010; Pan et al., 2011). Enfin, les hépatocytes ont également été décrits comme ayant un rôle dans la présentation de l'antigène. En effet, pendant l'inflammation les hépatocytes expriment le CMH-II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II), ce qui leur confère le rôle de CPA non professionnelles que nous avons précédemment abordé. Par ailleurs, il a été rapporté que les hépatocytes qui interagissent avec les lymphocytes T, participent à l'inflammation hépatique par l'intermédiaire de l'activation de la voie de signalisation Notch. En effet, la signalisation Notch dans les cellules Th1, générée après traitement par la concanavaline A, entraîne l'induction des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs et producteurs d'IL-10. En outre, dans des cas d'infection par le virus de l'hépatite

B, la signalisation Notch contribue à l'inflammation du foie en favorisant l'expansion des cellules productrices d'IL-22 (cellules innées lymphoïdes) ayant un rôle pro-inflammatoire dans cette pathologie (Burghardt et al., 2013; Luci et al., 2020; Wei et al., 2016).

ii. Cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSEC)

Les LSEC sont les cellules non parenchymateuses les plus abondantes dans le foie et représentent environ 15 à 20% des cellules hépatiques (Poisson et al., 2017; Wilkinson et al., 2020). Elles se situent dans les sinusoides et le parenchyme hépatique et forme une barrière entre la circulation et les hépatocytes sous-jacents ainsi que les cellules stellaires hépatiques (HSC) (Shetty et al., 2018; Sørensen et al., 2015). Les LSEC sont des acteurs clés dans la régulation du flux sanguin hépatique par l'intermédiaire de la production de médiateurs vasodilatateurs et la régulation des HSC (Wang and Peng, 2021; Wilkinson et al., 2020). Par ailleurs, les LSEC expriment de nombreux récepteurs endocytaires qui leur confèrent une importante capacité d'endocytose, faisant de ces cellules des « piègeurs » habiles impliqués dans l'élimination des déchets de la circulation, mais également dans la régulation de l'homéostasie lipidique (absorption des lipoprotéines de haute densité (HDL) et des lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées et acétylées) (Li et al., 2011; Pandey et al., 2020). Les LSEC sont également capables d'absorber des antigènes, par l'intermédiaire de l'endocytose médiée par le récepteur au mannose, suivie d'une présentation de l'antigène aux lymphocytes T (Diehl et al., 2008; Limmer et al., 2005). Ainsi, les LSEC possèdent également de nombreux rôles immunologiques gravitant autour de la reconnaissance des signaux de danger (LPS), la clairance virale (90% de la charge virale éliminée au cours d'une infection), la présentation de l'antigène (présentation croisée de l'antigène aux lymphocytes T CD8 via le CMH-I et aux T CD4 via le CMH-II) et le recrutement de leucocytes (Bhandari et al., 2021; Carambia et al., 2014; Øie et al., 2020; Shetty et al., 2018). Ainsi, au cours d'une inflammation chronique, des lésions répétées au niveau des hépatocytes entraînent la libération de DAMPs, détectés à la fois par les macrophages résidents (cellules de Kupffer) et les LSEC. Ces DAMPs vont alors déclencher le relargage de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-1 β , MCP1) suite à l'activation de la voie de signalisation NF- κ B et de l'inflammasome (S. Huang et al., 2018; Zhang et al., 2014). De plus, une fois activées, les LSEC vont à la fois sécréter des chimiokines et réguler à la hausse l'expression des molécules d'adhésion, facilitant ainsi le recrutement des leucocytes (S. Huang et al., 2018; Muller, 2016). De plus, la perte de fenestration des LSEC est décrit comme un évènement principal et précoce dans le

développement de pathologies hépatiques (Poisson et al., 2017). Par ailleurs, au cours d'une infection virale chronique, les LSEC voient le niveau de la protéine BMP4 (protéine morphologique osseuse 4) augmenter, ce qui favorise la réplication virale dans l'hépatocyte et aggrave les lésions hépatocytaires, maintenant ainsi la boucle inflammatoire (Herrera et al., 2017; Rowe et al., 2014; Wilkinson et al., 2020).

iii. Cellules stellaires hépatiques (HSC)

Les cellules stellaires hépatiques (HSC) font parties des cellules qui composent la fraction non parenchymateuse hépatique. Elles représentent 5 à 8% de toutes les cellules hépatiques et sont décrites comme des péricytes (cellules contractiles) stockant les graisses (Kamm and McCommis, 2022). Leur rôle précis dans un foie sain est beaucoup moins bien décrit que pour les autres types cellulaires hépatiques. Au cours de ces dernières décennies, les HSC au repos ont été considérées comme une cellule qui stocke la vitamine A (facteur clé dans la régulation des réponses immunitaires), régule le flux sanguin sinusoidal, joue un rôle dans la communication intercellulaire, synthétise des composants de la matrice extracellulaire et engendre la synthèse de médiateurs (polypeptides, érythropoïétine...) qui garantissent l'homéostasie du sinusode hépatique (Weiskirchen and Tacke, 2014). Cependant, suite à des lésions hépatiques les HSC sont capables d'adapter leur phénotype de manière très dynamique et de contribuer à la production de matrice extracellulaire riche en collagène, entraînant le développement d'une fibrose hépatique (Kamm and McCommis, 2022). D'un point de vue « réponse immunitaire », il a été mis en évidence que ces cellules avaient un rôle dans l'amplification de la réponse inflammatoire. En effet, les HSC sont capables de répondre aux DAMPs et PAMPs, de médier l'autophagie, d'exprimer des PRR et d'interagir avec de multiples cellules immunitaires afin de moduler leur activité ou favoriser leur différenciation. L'interaction que les HSC vont avoir avec les autres cellules immunitaires est bidirectionnelle. En effet, suite à des signaux ($TNF\alpha$, $IFN\gamma$...) provenant de cellules immunitaires individuelles, les HSC vont à leur tour produire de nombreux médiateurs inflammatoires solubles ($IL-6$, $TGF\beta$, $TNF\alpha$...) qui vont influencer les propriétés biologiques des cellules immunitaires. Ces interactions comprennent l'activation mutuelle des HSC et des macrophages, ou les signaux pro-apoptotiques des cellules NK et NKT sur les HSC activées. Les HSC expriment également différents récepteurs de type Toll-like (TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 et TLR9), interviennent dans la signalisation Hedgehog et sont équipées de plusieurs plateformes d'inflammasome intracellulaires qui déclenchent la réponse inflammatoire dans divers contextes pathologiques.

L'activation de la voie Hedgehog va entraîner l'expansion des populations de progéniteurs hépatiques afin de favoriser la régénération du foie mais aussi l'accumulation hépatique de cellules inflammatoires, la fibrogenèse hépatique et le remodelage vasculaire (Omenetti et al., 2011). Enfin, la vitamine A, dont les cellules stellaires sont la principale source hépatique, va être convertie par les LSEC en acide rétinoïque, ce qui va amorcer l'acquisition par les lymphocytes T CD4 d'un phénotype de « tropisme intestinal » médié par l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et de CCR9. En effet, normalement ces lymphocytes T CD4 $\alpha 4\beta 7^+$ sont retrouvés au niveau de l'intestin et agissent comme des médiateurs clés de la perturbation de la barrière intestinale (Carter and Friedman, 2022; Neumann et al., 2012).

iv. Cellules de Kupffer (KC)

Les macrophages hépatiques sont des populations cellulaires hétérogènes constituées de cellules résidentes, appelées cellules de Kupffer (KC), et de macrophages dérivés de monocytes (MoMF) qui sont recrutés à partir de la circulation vers le foie (Krenkel et al., 2018). Les KC sont les macrophages hépatiques prédominants dans le foie sain. Ils jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du foie à travers 5 fonctions : l'élimination de débris cellulaires et des déchets métaboliques (Brubaker et al., 2017; Deppermann et al., 2020), le maintien de l'homéostasie du fer par phagocytose des globules rouges (GR) (Scott and Williams, 2018; Theurl et al., 2016), la régulation de l'homéostasie du cholestérol (Wang et al., 2015), la médiation de la défense antimicrobienne (Zeng et al., 2016) et enfin la promotion de la tolérance immunologique (Heymann et al., 2015). Les KC de par leur position centrale dans le microenvironnement hépatique, leur expression importante de PRR en surface (récepteurs TLR et NLR), et leurs protubérances cytoplasmiques, agissent comme des acteurs clés de la première ligne de défense en cas de lésions hépatiques (Guillot and Tacke, 2019). Les cellules de Kupffer sont la principale source de production de CCL2, impliquée dans le recrutement des monocytes (MoMF Ly6C^{high} : macrophages hépatiques dérivés de monocytes de la moelle osseuse) via le récepteur CCR2 (Dambach et al., 2002; Marra and Tacke, 2014). Elles sécrètent également d'autres chimiokines responsables du recrutement des neutrophiles telles que : CXCL1, CXCL2, et CXCL8 (Marra and Tacke, 2014). Les MoMF Ly6C^{high}, infiltrés au niveau du foie vont également contribuer au recrutement d'autres populations leucocytaires par l'intermédiaire de différentes chimiokines. En effet, CXCL16 va être

impliquée dans le recrutement des cellules NKT (Wehr et al., 2013) et CCL5 et CXCL19 contribuent au recrutement des cellules T CD4 et T CD8 (Xia et al., 2019).

Par ailleurs, lors de maladies chroniques du foie, l'activation de l'inflammasome dans les KC joue un rôle important dans la médiation de la stéatose, de l'inflammation et des lésions hépatiques, suite à la production de molécules pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , TNF α et IL-18 (Ogura et al., 2006). Dans des cas d'infections de pathogènes ou de virus, l'activation de l'inflammasome dans les KC va dépendre du stimulus bactérien ou viral. En effet, lors d'une infection au VHB, la protéine HBeAg (protéine virale de l'hépatite B) va être capable de réprimer l'expression de NLRP3 via l'inhibition de l'activation de NF- κ B (Yu et al., 2017). A contrario, la protéine centrale du VHC va déclencher l'inflammasome et la production d'IL1- β , entraînant la mise en place de réponses pro-inflammatoires (Negash et al., 2019).

De plus, la contribution des KC au cours de diverses maladies du foie repose également sur un dialogue avec les autres types cellulaires hépatiques comme les HSC, les LSEC, les neutrophiles et les plaquettes. Les KC peuvent activer directement les HSC par l'intermédiaire de facteurs de croissance (TGF β , PDGF) (Cai et al., 2020) mais vont également libérer des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6, CCL5) capables d'interagir avec les HSC afin d'établir une niche profibrogénique tout en favorisant leur survie (Krenkel et al., 2018). Par ailleurs, la libération de TNF α par les KC active les LSEC et favorise l'expression de la molécule d'adhésion intracellulaire 1 (ICAM-1) et par conséquent la transmigration des monocytes (Wen et al., 2021). Enfin, des études plus récentes ont mis en évidence l'importance de l'interaction KC-plaquettes, impliquant la liaison de CD44 à l'acide hyaluronique, dans l'inflammation hépatique notamment par l'intermédiaire de la chaîne alpha de la glycoprotéine plaquettaire Ib (GPIb1) (Malehmir et al., 2019).

v. Cellules dendritiques (DC)

Le foie contient de multiples populations de cellules dendritiques (DC), incluant les cellules dendritiques myéloïdes classiques (mDC), les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), ainsi que d'autres populations plus complexes que je n'aborderai pas dans ce manuscrit (DC de « type lymphoïde » exprimant CD8- α et des DC-NK de lignée incertaine) (Crispe, 2011). Les cellules dendritiques classiques hépatiques font partie intégrante des cellules immunitaires hépatiques et représentent moins de 1% des cellules hépatiques non

parenchymateuses (Méndez-Sánchez et al., 2021). Ces cellules vont avoir un rôle important dans la régulation de l'homéostasie immunitaire et de la tolérance hépatique. Les DC sont surtout connues pour leur fonction de CPA en établissant ainsi un pont entre la réponse innée et adaptative (Hsu et al., 2007). En effet, lorsque les cellules dendritiques sont au repos, elles sont dans un état dit « immature » qui leur permet de maintenir la tolérance hépatique. Les DC tolérogènes qui sont associés à de faibles niveaux de CMH de classe I et II et à une expression élevée de ligands co-inhibiteurs des lymphocytes T, favorisent des effets tolérogéniques par la sécrétion des cytokines impliquées dans la tolérance immunitaire (IL-10 et TGF β) en favorisant la délétion des lymphocytes T et l'induction de lymphocytes T régulateurs (Treg) (Heymann and Tacke, 2016; Ibrahim et al., 2012; Schmidt et al., 2012; Zheng and Tian, 2019). Les DC sont capables de passer d'un état tolérant à un état actif de manière très rapide, induisant la mise en place d'une cascade inflammatoire en réponse à la stimulation TLR par exemple, et favorisant la mise en place d'une réponse immunitaire adaptée par la polarisation de LT Th1 et/ou Th2. Par ailleurs, ces cellules sont également impliquées dans le stockage des lipides dans le foie, ce qui leur fournit un lien important entre métabolisme des lipides et inflammation (You and Chi, 2023). En effet, il a été montré que les DC étaient capables d'accumuler les lipides. Les DC enrichis en lipides ont une puissante activité pro-inflammatoire par rapport aux DC pauvres en lipides qui sont plus tolérogènes (Ibrahim et al., 2012). Il a notamment été montré que les « DC lipidiques » expriment des niveaux importants de CMH de classe II qui favorisent la prolifération et l'activation des lymphocytes T producteurs de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6, TFN α et IL-2 (Méndez-Sánchez et al., 2021; Schmidt et al., 2012).

vi. Cellules T non conventionnelles

▪ *Les lymphocytes T $\gamma\delta$*

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont un sous-ensemble de lymphocytes non conventionnel avec un répertoire TCR limité non restreint par le CMH. Ils peuvent reconnaître une grande variété d'antigènes et peuvent être activés uniquement par des PAMPs, des DAMPs ou des cytokines. Chez l'Homme, la répartition des lymphocytes T $\gamma\delta$ est basée sur les segments du gène V δ utilisés pour produire leur TCR. Les lymphocytes T V δ 1⁺ sont abondants dans l'épithélium et ont pour fonction de protéger les tissus par la reconnaissance des CMH non classiques (CD1a, CD1c et CD1d). Les lymphocytes T V δ 2⁺ sont plus abondants dans la circulation et peuvent éliminer les infections dans les organes périphériques. Enfin les lymphocytes T V δ 3⁺ sont

enrichis dans le foie et sont impliqués dans certaines maladies telles qu'une infection virale chronique ou une leucémie (Shiromizu and Jancic, 2018; Yang Zhou, 2023). Les lymphocytes T $\gamma\delta$ humains ont été identifiés au niveau de la triade portale et plus particulièrement au niveau du conduit biliaire. Les fonctions effectrices des cellules T $\gamma\delta$ hépatiques dépendent du contexte, bien que les cellules T $\gamma\delta$ productrices d'IL-17A se localisent principalement dans le foie. Les cellules T $\gamma\delta$ produisant de l'IL17A jouent un rôle pathogène dans les lésions hépatiques induites par l'infection (Chen et al., 2013; Rajoriya et al., 2014), la stéatose hépatique métabolique (F. Li et al., 2017), l'hépatite auto-immune (Ujiie and Shevach, 2016), la fibrose/cirrhose hépatique (Seo et al., 2016) et le cancer du foie (Ma et al., 2014). D'autres part, les cellules T $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ hépatique jouent un rôle protecteur dans l'infection du foie (Agrati et al., 2006; Sardinha et al., 2006) et le cancer du foie et sont également des médiateurs de l'hépatite auto-immune (Wang and Tian, 2018).

- *Les lymphocytes T invariants associés aux muqueuses (MAIT)*

Les lymphocytes T invariants associés aux muqueuses (MAIT) sont un type de cellules abondantes chez l'Homme et en particulier dans le foie (Mehta et al., 2022). La spécificité de leur récepteur antigénique (TCR) est restreint pour la molécule MR1 (Treiner et al., 2003) liée au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Huang et al., 2009) qui présente un métabolite bactérien modifié de la voie de biosynthèse de la vitamine B2 (5-OP-Ru) (Corbett et al., 2014), ce qui leur permet de réagir en présence de nombreuses bactéries et levures. Les MAIT possèdent également un ensemble de récepteurs de cytokines (IL-15R, IL-18R, IFNR, IL-23R) (Mehta et al., 2022). Certaines fonctions des cellules MAIT peuvent être activées par la seule reconnaissance du complexe du ligand MR1, mais une activation optimale de ces cellules repose sur une co-stimulation avec des cytokines comme l'IL-12, IL-18, ou IFN γ (Ussher et al., 2014). Dans des cas d'infections virales (grippe et VHC) et de stéatohépatite, les cellules MAIT hépatiques sont très sensibles à l'activation cytokinique, indépendamment de leur TCR, ce qui leur confère une capacité de réponse pro-inflammatoire et fibrogénique importante avec une sécrétion d'IFN γ , de TNF α et d'IL17 (Mehta et al., 2022). En revanche, l'activation TCR des cellules MAIT, en l'absence de stimulations cytokiniques, induit un profil d'expression génique de réparation tissulaire et possiblement de régénération du foie (Constantinides et al., 2019; Hinks et al., 2019). Cependant, il est important de prendre en considération que chez la souris le niveau des cellules MAIT hépatiques est 100 fois plus faible que chez les Hommes. En effet, les MAIT représentent chez l'Homme 20 à 50% des

lymphocytes T, tandis que chez la souris les MAIT ne représentent que 0,4 à 0,6% de LT. En revanche le foie murin présente des niveaux beaucoup plus importants de cellules iNKT (invariant natural killer T) (Garner et al., 2018).

- *Les cellules iNKT (NKT)*

Dans le foie de la souris, les cellules iNKT représentent 40% du total des lymphocytes, tandis que chez l'Homme leur pourcentage ne représente que 10% et sont largement devancés par une prédominance des cellules NK (Gao et al., 2008). Le TCR des cellules iNKT reconnaît les lipides antigéniques présentés par la molécule CD1d de type CMH-I exprimé par les CPA telles que les KC, les DC et les hépatocytes (Kawano et al., 1997). Les cellules iNKT sont divisées en 2 sous-ensembles : les cellules iNKT invariantes (iNKT) (ligand : α -GalCer) et les cellules iNKT de type II (T2NKT) (ligand : sulfatide) (Bricard et al., 2010; Takahashi and Suzuki, 2012). Les cellules iNKT sont les cellules les plus décrites, de par leur enrichissement important dans le foie de souris. A contrario, le manque d'outils pour identifier et caractériser les cellules T2NKT, ainsi que leur faible nombre, rend leur étude plus complexe. Les cellules iNKT, en plus de leur TCR, expriment également des récepteurs de cytokines et des récepteurs Toll-like, ce qui leur confèrent une capacité de réponse aux signaux de dangers et aux cytokines produites par d'autres types cellulaires lors de lésions hépatiques (Yang Zhou, 2023). Une fois activées, les cellules iNKT ont un rôle pro-inflammatoire en sécrétant rapidement un large éventail de cytokines : IL-4, IL-17, IL-10 et IFN γ , qui vont en retour favoriser le recrutement de monocytes et de neutrophiles, mais également stimuler les lymphocytes T et B (Coquet et al., 2008; Sedimbi et al., 2020). Cependant, le rôle des cellules iNKT pourrait varier en fonction du stade de la MASLD (Metabolic dysfunction-Associated Steatotic Liver Diseases). En effet, il a été mis en évidence dans des modèles murins de stéatose hépatique, que la fréquence intrahépatique des cellules iNKT diminuaient et que celles-ci renaissent en apoptose (Kim et al., 2018). En revanche, à des stades plus tardifs, les cellules iNKT pourraient être activées par des molécules CD1d et participeraient à l'exacerbation de la stéatose, tout en diminuant la sensibilité à l'insuline via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Wu et al., 2012). Enfin, les quelques études menées sur les cellules T2NKT orientent leur rôle vers un phénotype anti-inflammatoire, par inhibition de la réponse immunitaire, y compris des iNKT, de manière directe et indirecte (Renukaradhya et al., 2008; Terabe and Berzofsky, 2014).

- *Les cellules innées lymphoïdes (ILC)*

Les cellules innées lymphoïdes (ILC) constituent une famille de cellules lymphoïdes effectrices homologues « innées » des lymphocytes T récemment décrite (Cella et al., 2010; Luci et al., 2009). Elles ont un rôle important dans la défense immunitaire (première ligne de défense de l'organisme), l'inflammation et le remodelage tissulaire (Y. Huang et al., 2018; Vivier et al., 2018). Elles se décomposent en 5 sous populations : les cellules NK, les ILC1, les ILC2, les ILC3 et les cellules inductrices de tissu lymphocytaire (LTi). Ces cellules sont principalement des cellules résidentes, à l'exception des cellules NK qui sont des cellules circulantes. Au cours des dernières années, il a été rapporté que presque toutes les sous-populations d'ILC jouent un rôle important dans l'homéostasie métabolique en régulant les fonctions du tissu adipeux, du foie et de l'intestin (Bernink et al., 2013; Nussbaum et al., 2013). Au niveau hépatique, les ILC induisent une immunité protectrice en réponse aux infections bactériennes et virales, maintiennent l'intégrité du tissu en contribuant au remodelage et à la cicatrisation tissulaire. Cependant, une activation chronique des ILC va également induire une inflammation (Vivier et al., 2018).

Les ILC étant le centre de mon projet de thèse, une partie leur est exclusivement consacrée dans ce manuscrit. Ainsi afin d'éviter une certaine redondance d'informations, j'aborderai plus en détails leur rôle et leur implication dans le foie et au cours de la MASLD dans la suite de ce manuscrit.

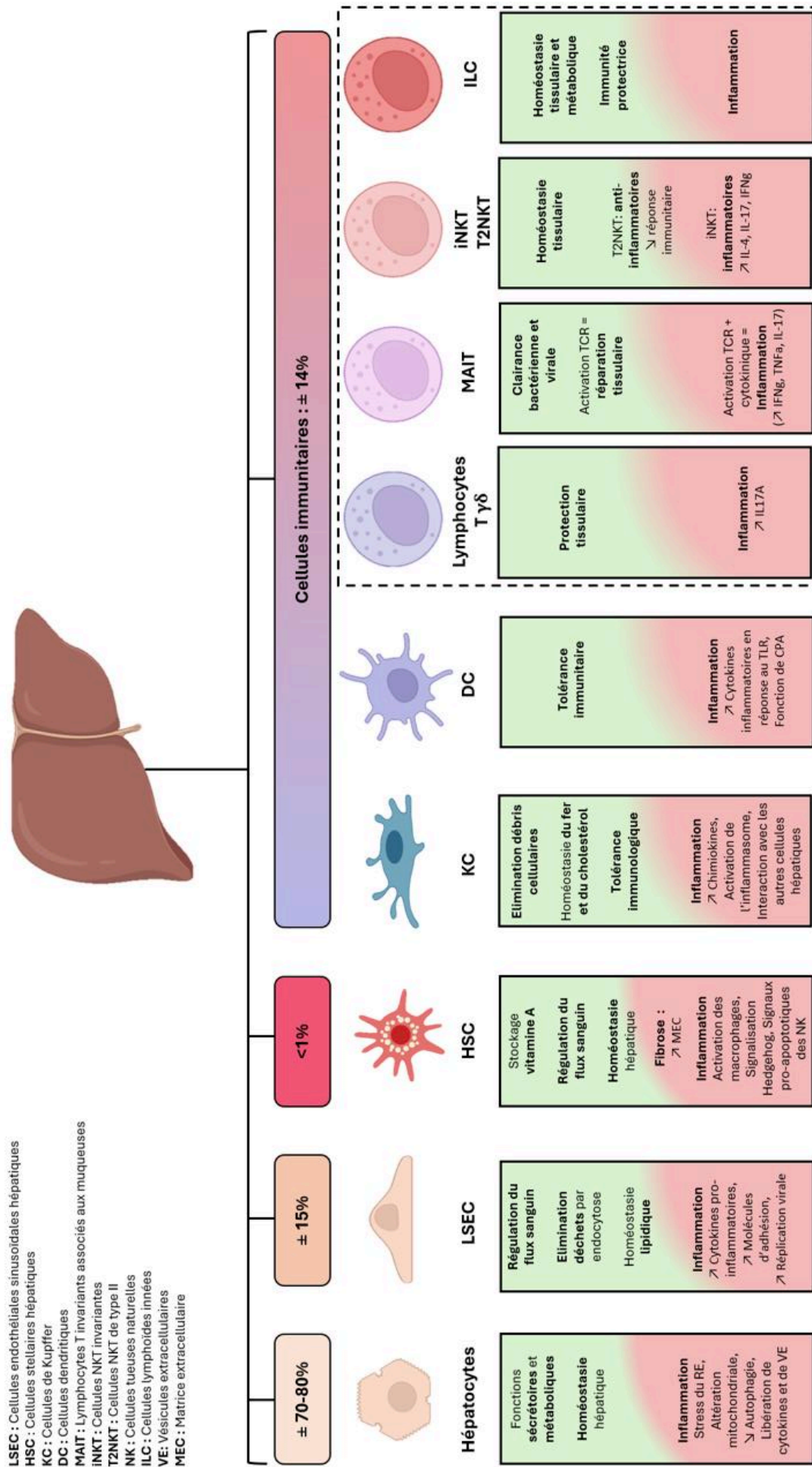


Figure 2. Diagramme arborescent de la fréquence approximative des cellules résidentes du foie et de leur fonction dans l'immunité hépatique.

(Adaptée de Yang Zhou, 2023)

II- Maladies chroniques associées à l'obésité : MASLD

a) Définition et diagnostic de la MASLD

i. Définition

La maladie hépatique stéatotique associée à un dysfonctionnement métabolique, ou MASLD (Metabolic dysfunction-Associated Steatotic Liver Diseases), autrefois connue sous le nom NAFLD (Non-Alcoholic fatty liver diseases), est la maladie du foie la plus répandue dans le monde avec une prévalence atteignant jusqu'à 32,4% de la population mondiale selon les estimations les plus récentes (Chan et al., 2023; Riazi et al., 2022). La MASLD est définie par une accumulation excessive de graisses dans le foie et est étroitement liée au diabète de type II (DT2) et à l'obésité (Spiers et al., 2022). Le spectre de la MASLD regroupe différents stades. Le premier stade est la stéatose dite « simple ». Cet état peut ensuite évoluer vers des formes plus sévères comme la stéatohépatite associée au métabolisme, ou MASH (Metabolic associated steatohepatitis), suivies de la fibrose, la cirrhose et enfin le développement potentiel d'un cancer primaire du foie, connu sous le nom de carcinome hépatocellulaire (CHC) (Luci et al., 2020; Tran and Gual, 2013) (**Figure 3**). La majorité des personnes souffrant de MASLD ont une stéatose simple avec un faible risque de progression et de mortalité. La présence du DT2 peut accélérer la progression de la maladie avec environ 10 à 20% des patients qui finissent par développer la MASH, forme inflammatoire progressive (Spiers et al., 2022). Il est important de préciser que la première cause de mortalité chez les patients atteints de MASLD sont les maladies cardiovasculaires. Cependant, les patients présentant une fibrose hépatique sévère courent un risque accru de mortalité et voient ce risque augmenter de manière exponentielle avec le stade de la fibrose (Dulai et al., 2017). Le fait que cette pathologie soit asymptomatique représente un réel problème dans sa prise en charge.

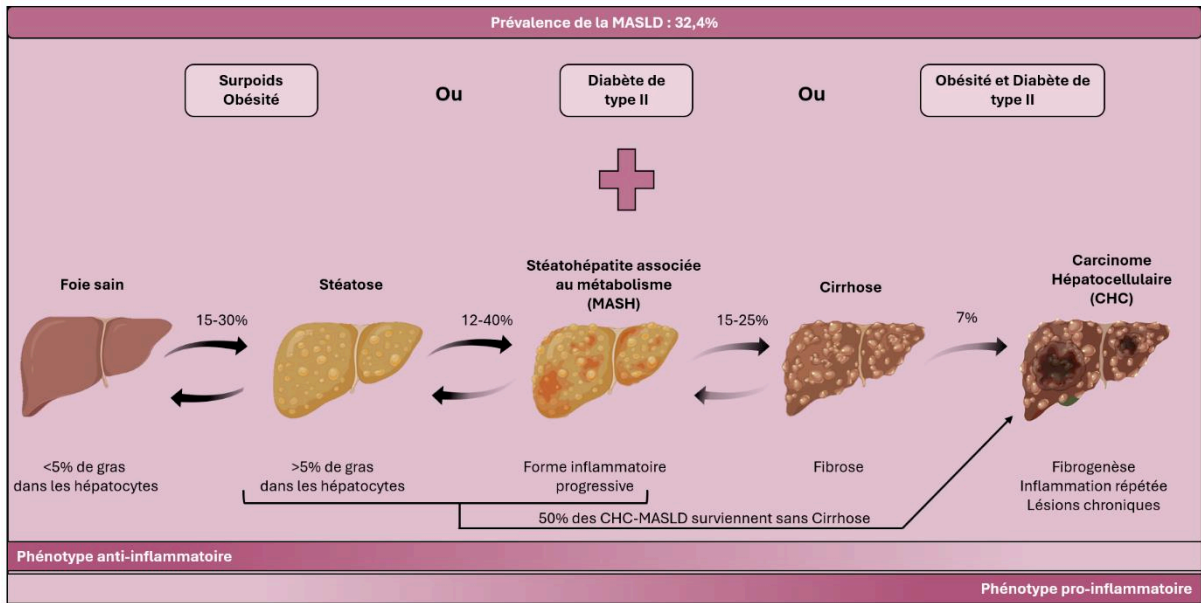


Figure 3. Spectre de la maladie hépatique stéatotique associée à un dysfonctionnement métabolique (MASLD) : stades et progression d'un foie sain à un carcinome hépatocellulaire.

La stéatose est le stade initial de la MASLD, caractérisé par une accumulation excessive de graisse dans les hépatocytes. Environ 12 à 40% des patients atteints de stéatose évoluent vers une stéatohépatite associée au métabolisme (MASH), qui se caractérise par des lésions hépatocytaires et une inflammation avec ou sans fibrose. En fin de compte, 15 à 25% des patients évoluent vers une cirrhose et un petit pourcentage (7% parmi les foies cirrhotiques) développe un carcinome hépatocellulaire. Il est également important de noter que 50% des CHC-MASLD surviennent sans cirrhose (Foerster et al., 2022) et 10% de tous les cas de CHC sont attribués à la MASLD (Llovet et al., 2023) .

(Adaptée de Velliou et al., 2023)

ii. Diagnostic

De manière générale, toutes les stéatoses hépatiques sont maintenant regroupées sous l'égide terme de « maladie hépatique stéatotique » (SLD). La stéatose peut être diagnostiquée par imagerie avec une échographie abdominale et est déterminée par une hyper-échogénicité hépatique (réflexion importante des ultrasons sous forme d'échos se traduisant sur l'image par des points blancs) et une vascularisation hépatique ayant un aspect flouté (Bril et al., 2015). S'en suit alors un diagnostic basé sur des critères d'exclusion : si les patients ont 1 élément sur les 5 du syndrome métabolique les patients ont une MASLD (à moins qu'il y ait d'autres causes de stéatose telles que la SLD liée à l'alcool). Par la suite, afin de pouvoir différencier de manière fiable le stade de la MASH et de la fibrose, la biopsie hépatique est rapidement devenue la

méthode de référence (Pai et al., 2019). Cependant, bien qu'elle soit de manière générale bien tolérée, cette technique reste un acte chirurgical invasif pouvant mener au développement de certaines complications telles que des saignements, des infections, des fuites biliaires... Cependant, au cours des dernières décennies, les limites de la biopsie hépatique, combinée à l'épidémie croissante de MASLD, ont favorisé le développement de techniques alternatives non invasives afin de servir d'outils de diagnostic. Ces stratégies s'appuient notamment sur la mise en place de scores et de biomarqueurs sériques. Tout d'abord, les concentrations d'enzymes hépatiques (transaminases : alanine aminotransférase (ALT) et aspartate aminotransférase (AST)) ont souvent été utilisées par les cliniciens afin d'évaluer les patients atteints de maladies du foie (Wong et al., 2009). Cependant, ces enzymes peuvent ne pas réellement refléter la gravité histologique. Le degré de fibrose étant le facteur prédictif le plus fort de la morbidité et de la mortalité liées aux maladies du foie, des scores sériques ont été développés afin de pouvoir identifier le degrés de fibrose (Mózes et al., 2022). Les scores les plus fréquemment utilisés sont : le score de fibrose de la NAFLD (NFS), l'indice de fibrose FIB-4 et l'indice du rapport entre l'aspartate aminotransférase et les plaquettes (APRI) (Tagkou and Goossens, 2023). Tous ces scores reposent sur des calculs établis à partir de paramètres de laboratoire, cliniques et démographiques (**Table 1**). La fibrose peut également être évaluée par imagerie non invasive comme : l'élastographie impulsionnelle à vibration contrôlée (VCTE) ou FibroScan, l'élastographie par résonance magnétique (Anstee et al., 2022). Par ailleurs, il existe également le test NIS4 (ou NASHnext), spécifiquement conçu pour identifier les patients atteints de MASH à risque et qui se base sur quatre biomarqueurs associés à la MASH. Plus récemment une version optimisée de ce test a été développée et validée : NIS2+. Ce nouveau test qui nécessite la combinaison de deux biomarqueurs (miR-34a5p et YKL-40 (marqueur de l'inflammation chronique)) ainsi qu'une correction de l'effet sexe sur le miR-34a5p, a démontré des performances cliniques robustes dans les sous-populations pertinentes pour la MASH (Ratziu et al., 2024). Cependant, cet outil de diagnostic présente tout de même certaines limites et son utilisation en routine est pour le moment inenvisageable. Enfin, la caractérisation de la MASH et l'évaluation de sa sévérité, s'effectuent au niveau histologique grâce au NAFLD Activity Score (NAS). Le NAS est établi par une anatomo-pathologiste et comprend l'évaluation du pourcentage de stéatose, du nombre de foci-inflammatoires et la présence d'hépatocytes ballonnés qui indiquent une souffrance hépatocytaire (Kleiner et al., 2005).

Prédiction MASLD: tests non-invasifs		Paramètres
Fibrose	FIB-4	Age, ASAT, ALAT, plaquettes
	NFS	Age, BMI, diabète, ASAT, ALT, plaquettes, albumine
	APRI	ASAT, ALT, plaquettes
MASH-fibrosante	NIS4	miR-34a5p, alpha-2 macroglobuline, YKL-40, hémoglobine glyquée
	NIS2+	miR-34a5p et YKL-40

Caractérisation histologique de la MASH		Paramètres
NAFLD Activity Score (NAS)	Grade de stéatose	
	Inflammation Lobulaire	
	Ballonisation hépatocellulaire	

Critère de définition du score	Score
<5%	0
5-33%	1
33-66%	2
>66%	3
Absence	0
<2 foci	1
2-4 foci	2
> 4 foci	3
Absence	0
Peu	1
Beaucoup	2

Tableau 1. Tests non invasifs de prédiction de la fibrose hépatique et de la MASH-fibrosante et critères d'évaluation du NAFLD Activity Score (NAS).

Le NAFLD activity score (NAS) évalue la sévérité de la MASLD. C'est la somme de différents paramètres : du grade de la stéatose, des foyers inflammatoires et des hépatocytes ballonnés.

(Adapté de Tagkou and Goossens, 2023) (Adapté de Kleiner et al., 2005).

b) Stéatose

La stéatose hépatique simple se caractérise par une accumulation de gouttelettes lipidiques macrovésiculaires et/ou microvésiculaires enrichies en triglycérides (TG) dans les hépatocytes, en l'absence d'inflammation ou de lésions hépatiques. Plus spécifiquement, la stéatose hépatique, ou foie gras, est définie par un taux de TG intrahépatique représentant au moins 5% du poids du foie en l'absence de facteurs contributifs secondaires tels qu'une consommation excessive d'alcool, une infection virale ou des traitements médicamenteux. La stéatose hépatique simple est une affection réversible qui peut être corrigée par une modification du mode de vie des patients comme au travers d'un rééquilibrage alimentaire ou la mise en place d'une activité physique régulière (Nassir et al., 2015). Dans des conditions normales, le foie ne stocke pas les TG. Cependant dans des contextes où le foie est exposé à des signaux de stress tels que l'obésité, un métabolisme lipidique anormal, et un apport riche en graisses et glucides, une accumulation de lipides hépatiques ectopiques se met alors en place

et l'incapacité du foie à gérer cet excès de lipides va engendrer le développement de la stéatose (Machado and Diehl, 2016). De manière plus spécifique, il a été mis en évidence dans un contexte de MASH qu'une augmentation de la lipolyse au niveau du tissu adipeux insulino-résistant est responsable de quasiment 60% d'acides gras non estérifiés au niveau du foie. L'hyperglycémie combinée à une hyperinsulinémie favorisent quant à elles une augmentation de la lipogenèse de *novo* (conversion de l'acétyl-CoA en acides gras) responsable de la production de 26% des acides gras. Enfin, l'apport alimentaire est responsable du transport de 14% d'acides gras vers le foie par l'intermédiaire de chylomicrons. Ces différents acides gras qui parviennent jusqu'au foie vont alors être oxydés par β -oxydation ou estérifiés en TG et conditionnés en lipoprotéines qui vont être soit sécrétées sous forme de VLDL dans la circulation après combinaison avec l'apolipoprotéine B, ou stockées dans le foie sous forme de gouttelettes lipidiques (Donnelly et al., 2005; Fuchs et al., 2014). L'accumulation des acides gras libres au sein du foie, vont inhiber les voies hépatiques de signalisation de l'insuline et favoriser la stéatose. Ainsi l'accumulation de TG dans le foie et les lésions hépatocellulaires qui en résultent sont multifactorielles et impliquent plusieurs organes (tissu adipeux, intestin) (Nassir et al., 2015) (**Figure 4**). Il est également important de préciser que la stéatose est un état que l'on retrouve aussi à des stades plus avancés comme la MASH ou la MASH fibrosante et qui finit par diminuer avec la sévérité de la fibrose (Nagaya et al., 2008).

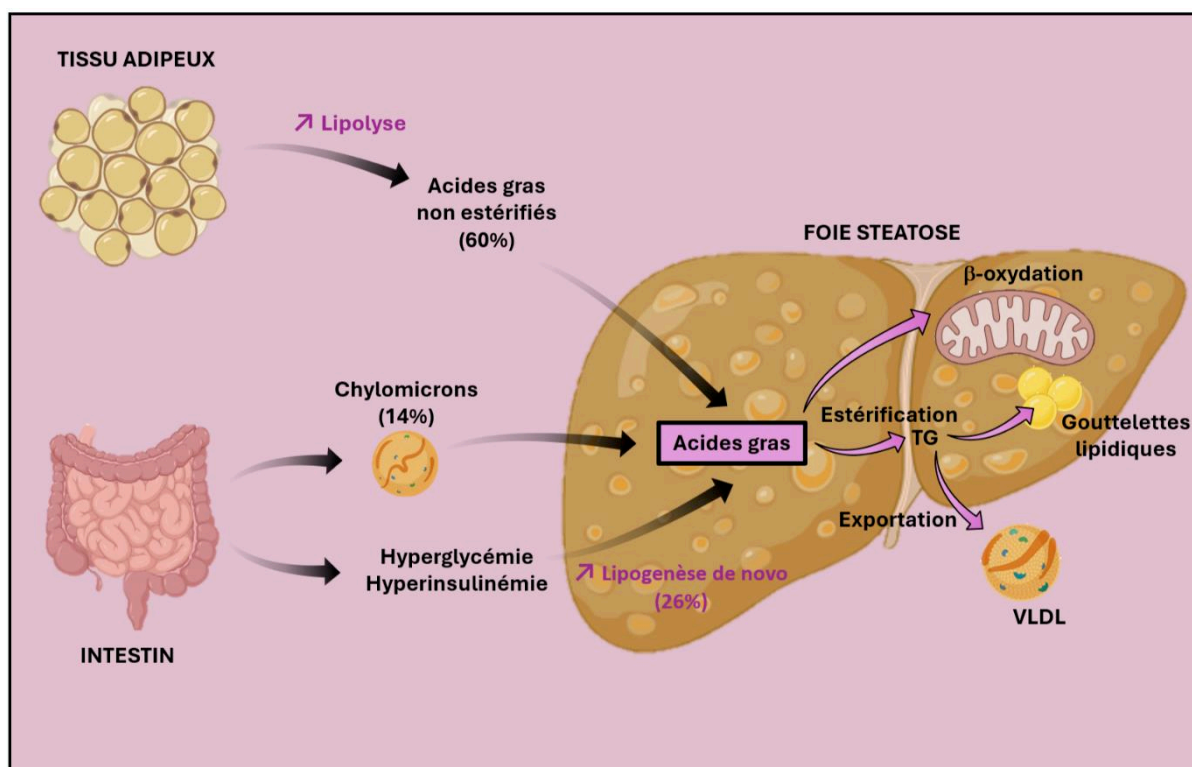


Figure 4. La pathogenèse de la stéatose hépatique.

Dans des conditions physiologiques, le pool d'acides gras hépatiques est le résultat d'un équilibre entre l'afflux d'acides gras provenant de l'alimentation et la lipolyse du tissu adipeux, la lipogenèse *de novo* et l'élimination des acides gras par β -oxydation ou assemblage et sécrétions de lipoprotéines de très basse densité (VLDL). Cependant, l'augmentation de l'absorption des acides gras et la réduction de leur clairance, entraînent l'accumulation de gouttelettes lipidiques et le développement de la stéatose hépatique. (Adaptée de Nassir et al., 2015)

c) La MASH

La stéatohépatite associée au métabolisme (MASH) est décrite comme la forme progressive de la MASLD et se caractérise par une stéatose, une inflammation ainsi qu'une ballonnisation des hépatocytes. Il est important de pouvoir clairement identifier les différents facteurs qui induisent la mise en place de l'inflammation hépatique et qui par conséquent alimentent la transition de la MASL vers la MASH. Parmi les responsables de cette inflammation hépatique des acteurs à la fois extrahépatiques (**Figures 5 et 6**) et intrahépatiques (**Figure 7**) ont été identifiés.

i. Facteurs extrahépatiques dans la MASH

▪ *Le tissu adipeux (AT)*

Chez l'Homme il existe deux types différents de tissus adipeux : le tissu adipeux brun (BAT) et le tissu adipeux blanc (WAT) (Saely et al., 2012; Xiaoxiao Wang et al., 2021). Le WAT est la forme prédominante de tissu adipeux chez les adultes et est impliqué dans le stockage des graisses. Le BAT quant à lui est principalement situé dans des petites régions des nouveau-nés et est responsable de la production de chaleur. Des preuves récentes ont tout de même indiquées que le BAT activé pouvait se trouver dans des dépôts adipeux spécifiques chez l'Homme adulte, dont certains révèlent un potentiel thermogénique (Leitner et al., 2017). L'obésité se caractérise principalement par une augmentation de la taille du WAT avec des changements significatifs dans sa fonction sécrétoire (Hajer et al., 2008; Xiaoxiao Wang et al., 2021). Le WAT va sécréter des adipokines ainsi que diverses substances bioactives comme la leptine, l'IL-6, l'IL-1 β , et le TNF α . Ces acteurs moléculaires vont activement participer à plusieurs mécanismes physiopathologiques : métabolisme du glucose, métabolisme lipidique, réponses inflammatoires. En effet, l'obésité cumulée à une insulino-résistance entraîne une hypertrophie des adipocytes et la mise en place d'une inflammation chronique de bas bruit. Les adipocytes vont notamment produire en quantité la chimiokine CCL2 impliquée dans le recrutement des monocytes, mais également d'autres cellules immunitaires comme les macrophages, les neutrophiles ou les lymphocytes T. Par ailleurs, il a été mis en évidence que la leptine, hormone sécrétée par le WAT, présente des niveaux positivement corrélés avec la masse grasse, le poids corporel et la sévérité de la MASLD. De plus, une concentration importante en leptine est une caractéristique liée à l'obésité et favorise les mécanismes pro-inflammatoires (Rotundo et al., 2018). En effet, dans le WAT, la leptine va induire la prolifération des LT de type Th1, des T CD8+ ainsi que des macrophages (Procaccini et al., 2012). L'ensemble de ces mécanismes vont ainsi favoriser la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire et constituer un lien de causalité entre le développement d'une résistance à l'insuline et la MASLD (Bertola et al., 2012, 2009) (**Figure 5**). De plus, les cellules innées lymphoïdes de groupe 1 ont été décrites pour avoir un rôle important dans la polarisation des macrophages au sein du TA au cours de la MASH. Cet aspect sera détaillé ultérieurement dans une autre partie de ce manuscrit.

Par la suite une autre hormone, l'adiponectine, sécrétée par les adipocytes et qui régule de manière critique la sensibilité à l'insuline, a également été décrite comme étant impliquée dans la physiopathologie de la MASLD (Shabalala et al., 2020; Xie et al., 2018) notamment pour ses effets anti-stéatosique et anti-apoptotique sur les hépatocytes (activation des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxydase (PPAR)) et ses effets anti-inflammatoire et anti-fibrotique sur les KC et HSC (Matsumoto et al., 2006). Des études ont également mis en évidence qu'une réduction de l'adiponectine hépatique pourrait aggraver notamment la MASH (Kaser et al., 2005) (**Figure 5**).

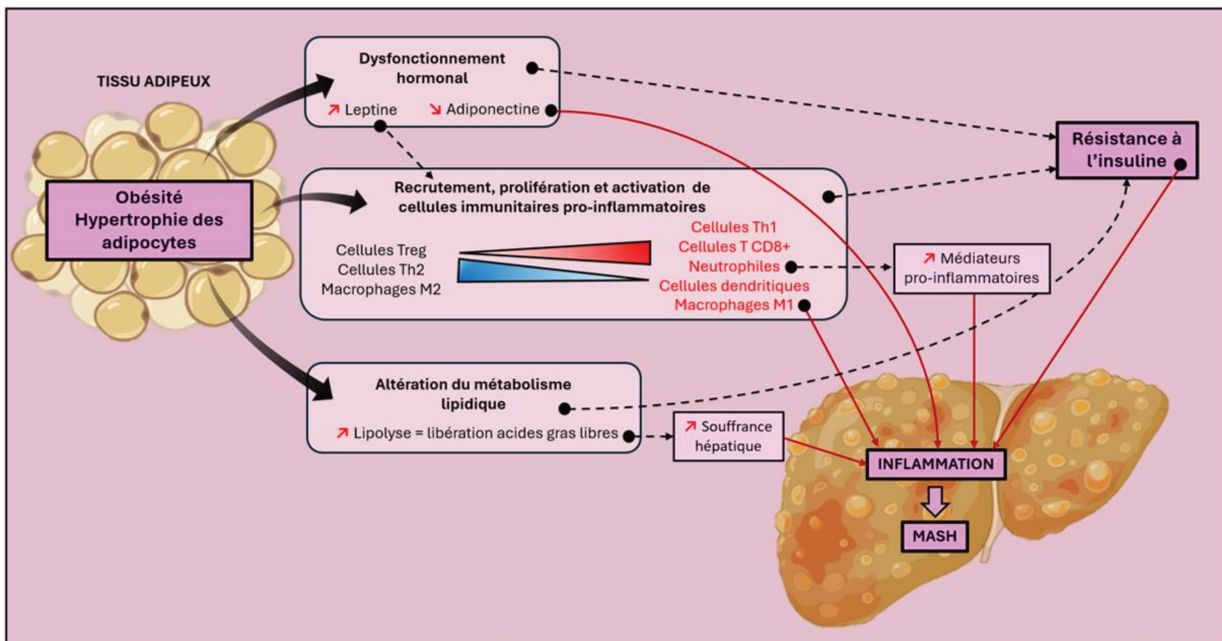


Figure 5. L'inflammation du tissu adipeux favorise la progression de la MASH.

L'hypertrophie des adipocytes pendant l'obésité va engendrer plusieurs mécanismes responsables de la mise en place d'une inflammation au niveau hépatique et par conséquent du développement de la MASH : i- un dysfonctionnement hormonal illustré par une augmentation de leptine et une diminution d'adiponectine ; ii- Le recrutement, la prolifération et l'activation de cellules immunitaires pro-inflammatoires (cellules Th1, cellules T CD8+, neutrophiles, cellules dendritiques et macrophages) ; iii- une altération du métabolisme lipidique illustré par une augmentation de la lipolyse favorisant la souffrance hépatocytaire. (Adaptée de Han and Levings, 2013 et Rodrigues et al., 2021)

Cependant, bien que le WAT semble être clairement impliqué dans des mécanismes favorisant le développement de la MASLD, il est important de tout de même prendre en considération les fonctions différentielles des dépôts de tissu adipeux. En effet, il a été démontré que différents dépôts de WAT présentent des fonctions variées. Les résultats d'une étude récente ont indiqué

que la WAT viscéral est un déterminant majeur de la sévérité de la stéatose et de la rigidité hépatique et son élimination empêche la mise en place d'une résistance à l'insuline induite par l'obésité (Nobarani et al., 2022). A l'inverse, l'élimination du WAT mésentérique, qui régule son propre état inflammatoire et maintient l'intégrité de la barrière intestinale, a aggravé le développement de la MASLD (Wu et al., 2019).

Le BAT quant à lui, présente des effets protecteurs. En effet, une étude a montré aux Etats Unis qu'une activité importante du BAT est associée à une amélioration de l'obésité et des troubles métaboliques comme la glycémie, le DT2 et les dépôts de graisses hépatiques (Ahmed et al., 2021). Ainsi le BAT pourrait être impliqué dans le métabolisme hépatique par l'intermédiaire de mécanismes sous-jacents tels que : la diminution d'acides gras circulants pour réduire la lipotoxicité hépatique, la sécrétion de cytokines afin de réguler le métabolisme lipidique hépatique, et par des interactions avec d'autres organes pour limiter les dépôts de lipides hépatiques (Xiaoxiao Wang et al., 2021).

- *L'axe intestin-foie*

Le tractus gastro-intestinal abrite l'une des plus grandes zones d'interaction luminale du corps humain et joue un rôle capital dans la régulation du système immunitaire. La muqueuse gastro-intestinale va agir comme une barrière semi-perméable qui va pouvoir permettre la détection immunitaire ainsi que l'absorption de nutriments, tout en limitant le transport d'antigènes et de micro-organismes. Cette fonction est assurée grâce à des interactions entre les composants qui structurent la muqueuse, mais également par des interactions moléculaires. L'ensemble de ces mécanismes permettent de maintenir l'intégrité intestinale. De manière plus précise, la muqueuse intestinale est composée: i- d'une couche de mucus externe comprenant le microbiote intestinal commensal, des protéines antimicrobiennes (AMPs) et des molécules d'immunoglobuline A sécrétoires (IgA); ii- d'une couche unicellulaire centrale comprenant les cellules épithéliales et la lamina propria interne où se situent les cellules immunitaires innées et adaptatives (lymphocytes T et B, les macrophages, et les DC) (Vancamelbeke and Vermeire, 2017). Les cellules épithéliales intestinales forment une monocouche et sont étroitement liées entre elles par des complexes jonctionnels. Les jonctions adhérentes et les desmosomes ont pour rôle de créer des liaisons d'adhésion cellulaire strictes et aident au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. On retrouve également des jonctions serrées (claudine, occludine, zonula occludens (ZO)-1, ZO-2, JAM), qui se situent sur la face apicale des cellules et qui

régulent le transport de petites molécules et d'ions (Groschwitz and Hogan, 2009). La barrière intestinale n'est pas une structure statique, mais plutôt une structure dynamique qui réagit aux stimuli internes et exogènes. En ce qui concerne le microbiote intestinal commensal, son abondance microbienne comprend des bactéries entériques qui représentent 99,1% de la microflore, des archées pour la majorité du reste et enfin seulement 0,1% de champignons et de virus. Le microbiote intestinal est principalement dominé par les phylums *Firmicutes* et *Bacteroidetes* (Yue et al., 2020).

L'apparition de la MASH est liée à un déséquilibre du microbiote et à un dysfonctionnement de la barrière intestinale (**Figure 6**). Il a clairement été démontré que la qualité de l'alimentation pouvait fortement influencer la composition du microbiote intestinal et engendrer le développement de ce que l'on appelle une dysbiose (Boursier et al., 2016). Ce déséquilibre de la flore intestinale a de nombreuses conséquences qui incluent : une inflammation et une altération de la perméabilité intestinale, ainsi qu'un déséquilibre de la quantité d'antigènes bactériens (Sinakos et al., 2022). En effet, l'expression du récepteur 1 de la chimiokine CX3C (CX3CR1) est décrite pour réguler la perméabilité intestinale. Or des études ont mis en évidence au travers de modèles murins d'atteintes hépatiques, que la délétion de CX3CR1 entraînait l'altération de la barrière intestinale et exacerbait l'apparition de la MASH (Ni et al., 2022; Song et al., 2023). Par ailleurs, il a été montré chez des patients atteints de MASH que les niveaux d'expression de la molécule d'adhésion JAM-A étaient diminués et l'inflammation des muqueuses elle était augmentée (Rahman et al., 2016). Il en est de même pour d'autres types de molécules d'adhésion comme ZO-1 où sa diminution est clairement associée à la MASH (Xin et al., 2014). De plus, chez les souris dépourvues de JAM, l'augmentation de la perméabilité intestinale entraîne une translocation bactérienne vers le foie ce qui favorise la MASH. Par ailleurs, la libération d'endotoxines dans la circulation de patients MASH, induit l'activation des cellules immunitaires du foie et par conséquent favorise la mise en place d'une réponse inflammatoire (Farhadi et al., 2008; Sinakos et al., 2022).

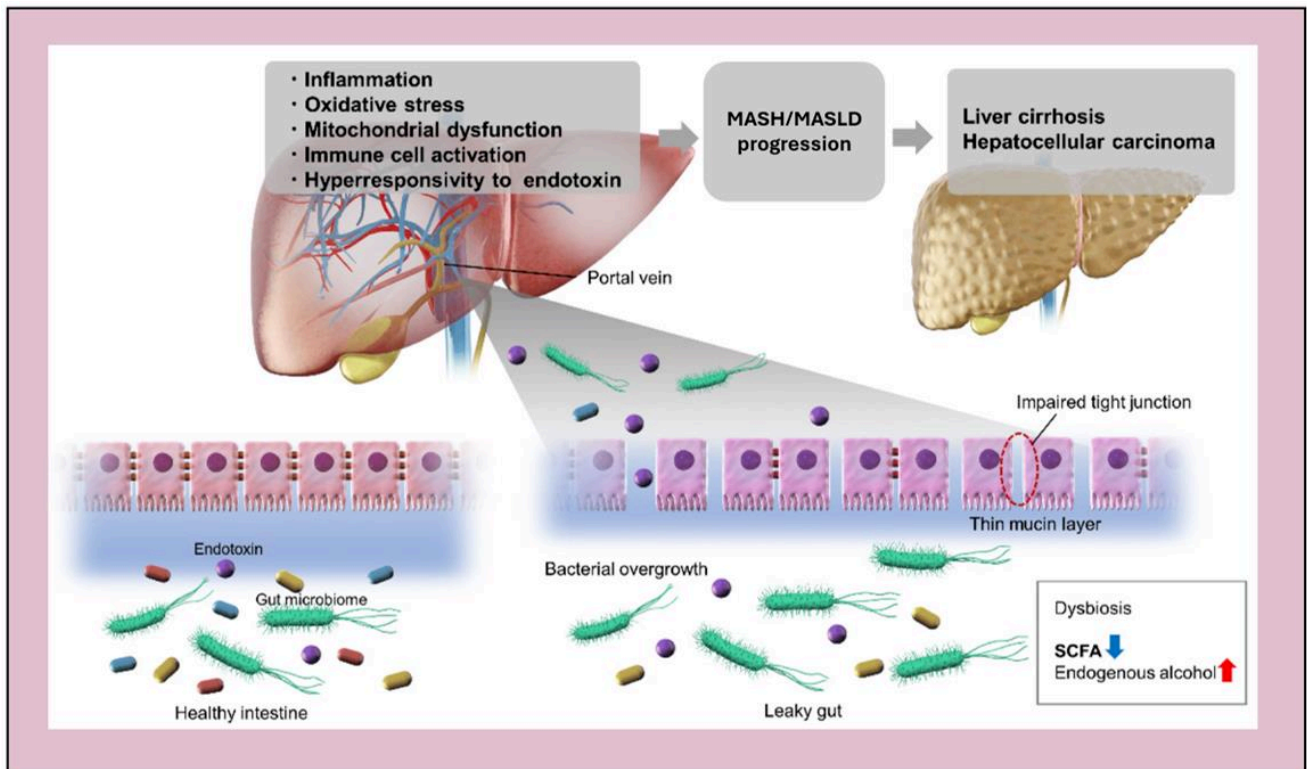


Figure 6. Représentation schématique de l'axe intestin-foie au cours de la MASLD.

(Extrait de Kobayashi et al., 2022)

Les acides biliaries ont également un rôle dans le développement de la MASH (Jia et al., 2021). En effet, ces acides biliaries ont pour fonction un effet régulateur important sur le métabolisme des lipides et des glucides. Ainsi leur dérégulation au sein de l'organisme peut générer un déséquilibre des niveaux de glucose et de lipides dans l'organisme et favoriser la mise en place d'une inflammation et de la fibrose (Sheng et al., 2022). De manière intéressante, le microbiote intestinal ainsi que les acides biliaries sont interdépendants puisqu'une modification du métabolisme des acides biliaries est capable d'affecter la composition du microbiote et en retour une dysbiose intestinale peut moduler la composition des acides biliaries, ce qui favorise le développement de la MASH (Song et al., 2023). Il est tout de même important de préciser que 90% de ces acides biliaries sont réabsorbés. Des études ont mis en évidence que les patients atteints de MASH présentaient des niveaux plus élevés d'acides biliaries que ceux atteints de MASLD et que cette altération du métabolisme des acides biliaries était associée aux caractéristiques histologiques de la MASH (Abdelmalek, 2021).

ii. Facteurs/acteurs intrahépatiques dans la MASH

Les mécanismes complexes de la pathogenèse de la MASH reposent également sur de nombreux facteurs et acteurs intrahépatiques. En effet, une modification de la réponse immunitaire hépatique et des mécanismes de stress cellulaire sont clairement observés au cours de la MASH et participent activement à la mise en place de l'état inflammatoire chronique (**Figure 7**).

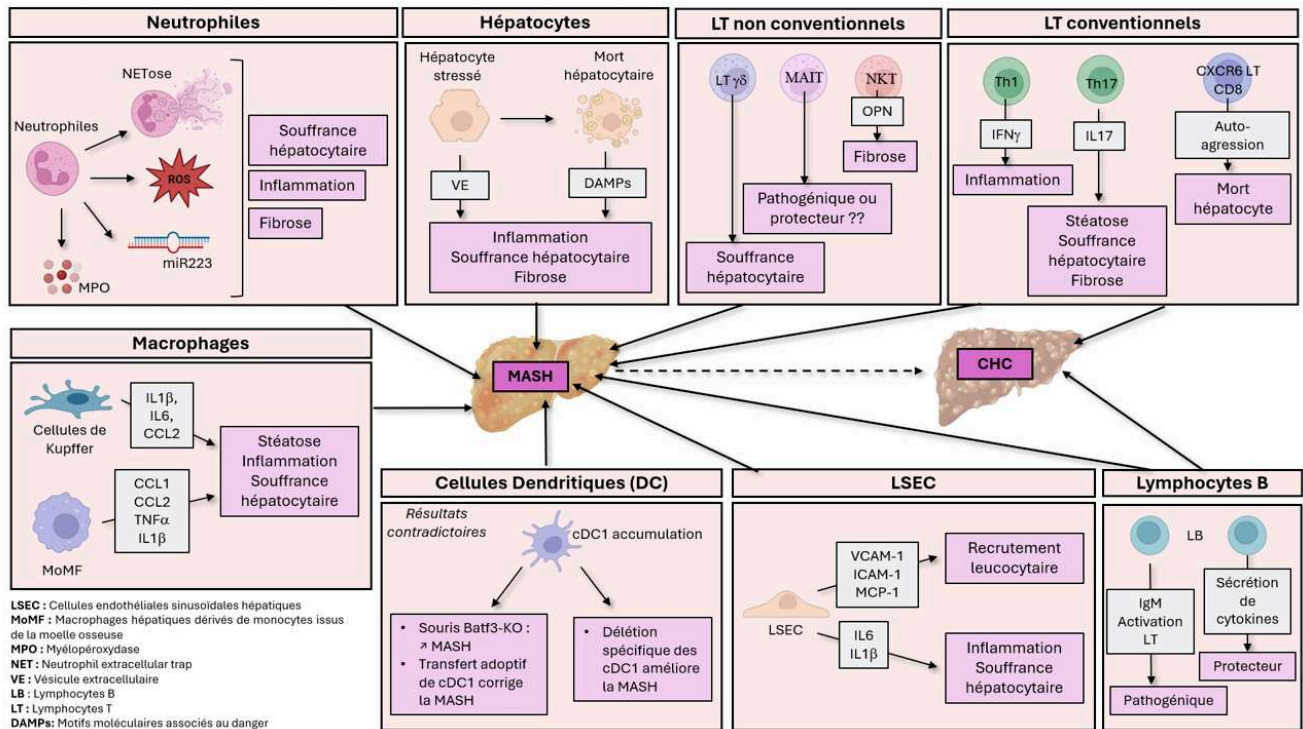


Figure 7. Schéma récapitulatif des différents acteurs intrahépatiques impliqués dans la mise en place de l'inflammation hépatique au cours de la MASH et de la progression de la MASLD.

(Adaptée de Huby and Gautier, 2022)

▪ *La Lipotoxicité*

La quantité excessive de lipides toxiques qui s'accumulent dans les hépatocytes va déclencher un mécanisme nocif pour le foie connu sous le nom de lipotoxicité qui conduit à la mort des hépatocytes, notamment par apoptose (Branković et al., 2022). Dans des conditions physiologiques, la lipotoxicité est régulée par le mécanisme d'autophagie qui comprend l'envoi de l'excès de lipides aux lysosomes pour être dégradés. Cependant en cas d'hyperinsulinémie et d'accumulation excessive de lipides, l'autophagie va être perturbée ce qui potentialise

l'apoptose des hépatocytes (Dong and Czaja, 2011). Ainsi, la lipotoxicité est l'un des principaux facteurs de développement de MASLD et de la MASH. L'accumulation de lipides toxiques dans le cytoplasme des hépatocytes entraîne un dysfonctionnement des organites (RE et mitochondries), des lésions cellulaires et l'apoptose de ces cellules (Ertunc and Hotamisligil, 2016). Comme je l'ai précédemment décrit, l'accumulation de lipides nocifs dans les hépatocytes est étroitement liée à l'interaction entre le foie et le tissu adipeux. Suite à la lipolyse du tissu adipeux, les acides gras libres atteignent le foie via la circulation systémique et s'y accumulent sous forme de gouttelettes lipidiques après estérification (Schweiger et al., 2017). Ce mode d'action est la principale cause d'accumulation de TG dans le foie. Un second mécanisme par lequel la quantité de TG dans le foie augmente est leur synthèse *de novo* (Vatner et al., 2015). Ce processus est régulé par deux facteurs transcriptionnels : la protéine de liaison à l'élément régulateur des stérols 1c (SREBP1c) et la protéine de liaison à l'élément régulateur de stérols 1c (ChREBP) (Kawano and Cohen, 2013). De manière intéressante, il a été mis en évidence que les acides gras libres insaturés comme le palmitate et le stéarate étaient plus nocifs dans le développement de la stéatose et de l'inflammation (Hirsova et al., 2016). A la différence, les acides gras libres monoinsaturés, tel que l'oléate, sont moins nocifs et présentent même un effet protecteur avec une réduction des niveaux de protéines pro-apoptotique (Bcl-2, BIM, PUMA) (Li et al., 2009). La différence entre l'impact des acides gras libres insaturés et monoinsaturés semble provenir d'un mécanisme différent à transformer du palmitate en TG et en ester de cholestérol.

- *Les hépatocytes*

Les hépatocytes vont jouer un rôle important dans le développement de l'inflammation locale au cours de la MASH. Dans des conditions physiologiques, l'accumulation de triglycérides dans les gouttelettes lipidiques est un mécanisme de protection qui prévient la lipotoxicité en tamponnant les acides gras libres toxiques (Listenberger et al., 2003). Cependant, ce mécanisme de protection peut très rapidement être débordé, notamment dans des pathologies liées à l'obésité et qui présentent par conséquent un excès d'acides gras. En effet, des altérations dans le remodelage des gouttelettes lipidiques ou dans la mobilisation des lipides sont responsables de l'augmentation de la lipotoxicité des hépatocytes (Luci et al., 2020). Par ailleurs, les protéines impliquées dans l'homéostasie des lipides hépatiques peuvent être exprimées de manière différentielle et médier la *progression de novo* de la MASLD. C'est notamment le cas de FSP27b/CIDEC2 (régulateur de la synthèse des gouttelettes lipidiques, de

l'homéostasie lipidique hépatique et de la mort cellulaire), dont l'expression est progressivement augmentée avec la stéatose simple puis la stéatohépatite, ce qui pourrait refléter le passage de la synthèse de gouttelettes lipidiques protectrices à la mort des hépatocytes (Sans et al., 2019). Les hépatocytes gras et stressés, vont alors libérer des signaux de danger tels que les DAMPs, les alarmines et les corps apoptotiques, suite à la mise en place et à la dérégulation de certains mécanismes précédemment évoqués comme le stress du RE ainsi qu'un dysfonctionnement mitochondrial. Différents types de mort hépatocytaire ont été associés à l'inflammation hépatique induite par la MASH tels que l'apoptose, la nécrose, la pyroptose et la ferroptose (Gautheron et al., 2020; Ibrahim et al., 2018). Les hépatocytes apoptotiques peuvent directement initier une inflammation telle que l'activation des macrophages après phagocytose des corps apoptotiques. Les formes lytiques de mort hépatocellulaire provoquent également de fortes réponses inflammatoires par la libération de composants cellulaires tels que les DAMPs qui vont contribuer au recrutement et à l'activation des cellules inflammatoires et des HSC (Ibrahim et al., 2018; Luci et al., 2020). De plus, la libération des vésicules extracellulaires enrichies en céramides et en CXCL10 régulent le trafic hépatique et l'infiltration des monocytes et macrophages. Enfin, la détection des pathogènes par les PRR des hépatocytes (TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, NOD1, NOD2, cGMP-AMP synthase) est fortement impliquée dans la régulation de la réponse inflammatoire innée autonome des cellules, conduisant à une augmentation de l'inflammation locale (Cai et al., 2019; Garcia-Martinez et al., 2016).

- *Les LSEC*

Comme je l'ai précédemment évoqué, les LSEC sont les gardiens de l'homéostasie hépatique notamment grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires et anti-fibrogènes qui empêchent l'activation des KC et des HSC. Au début du spectre de la MASLD, la capillarisation des LSEC entraîne la perte des fenêtres mais également la perte d'expression de leurs récepteurs scavengers et de leurs propriétés d'endocytose. Ces différents changements vont notamment modifier le transfert des chylomicrons résiduels nécessaires à la synthèse des VLDL vers les hépatocytes. Par ailleurs, les LSEC sont des producteurs d'oxyde nitrique (NO) connu pour limiter la *lipogenèse de novo* et améliorer la β -oxydation des acides gras dans les hépatocytes. Cependant, la synthèse et la libération de NO par les LSEC diminuent avec la résistance à l'insuline et la dyslipidémie, ce qui altère le rôle protecteur et local de NO dans la régulation de la teneur en lipides des hépatocytes (Pasarín et al., 2012). Plus récemment, il a été montré que

chez des souris nourries avec un régime inducteur de MASH, l'activation spécifique de Notch dans les LSEC inhibe la transcription de eNOS (endothelial nitric oxide synthase) et aggrave la NASH, tandis que l'administration d'activateurs pharmacologiques de eNOS ou des inhibiteurs de Notch améliore le dysfonctionnement de la capillarisation des LSEC, ce qui entraîne une amélioration de la stéatose hépatique et de l'inflammation hépatique (Fang et al., 2022). Au cours de la MASH, l'inflammation et les signaux provenant du microbiote intestinal augmentent l'activation de la voie NF- κ B dans les LSEC par l'intermédiaire du TLR9 qu'elles expriment à leur surface (Martin-Armas et al., 2006). L'activation de la voie NF- κ B entraîne par conséquent la libération de médiateurs pro-inflammatoires (MCP-1, IL-1, IL-6, TNF α) et l'expression de molécules d'adhésion telles que la molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1 (VCAM-1), la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et la protéine d'adhésion vasculaire-1 (VAP-1) (Furuta et al., 2021). Les LSEC deviennent donc d'importants médiateurs inflammatoires et amplifient l'inflammation locale et les lésions hépatiques en favorisant le recrutement de leucocytes. En effet, les LSEC soumises à un stress lipotoxique ou à une stimulation par des cytokines secrètent des ligands du motif C-X-C et des ligands des chimiokines du motif C-C, ce qui favorise la chimiotaxie des cellules immunitaires pro-inflammatoires (Miyachi et al., 2017). De plus, les LSEC par l'intermédiaire de DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines), peuvent présenter des chimiokines produites par les cellules voisines afin de permettre la migration transendothéliale des cellules pro-inflammatoires (Ramachandran et al., 2019). Les LSEC altérées vont également être capables de libérer des médiateurs fibrogéniques, y compris des molécules de la signalisation Hedgehog favorisant la fibrose hépatique (Hammoutene and Rautou, 2019; Luci et al., 2020).

- *Les cellules de Kupffer et les MoMF*

Les cellules de Kupffer (KC) et les macrophages hépatiques dérivés de monocytes de la moelle osseuse (MoMF) sont également des acteurs inflammatoires importants au cours de la MASH. Les KC faisant parties des principaux senseurs des lésions hépatiques, vont rapidement sécréter un certain nombre de chimiokines et notamment du CCL2 qui va permettre le recrutement des MoMF via le récepteur CCR2 (Dambach et al., 2002; Marra and Tacke, 2014). Chez des souris nourries avec un régime High Fat Diet (HFD), les MoMF Ly6C^{high} produisent du CCL5 et du CXCL9 d'une manière dépendante de la protéine de liaison A9 au calcium S100 (S100A9). Ces chimiokines entraînent le recrutement hépatique de LT CD4 et CD8 qui contribuent à la résistance à l'insuline (Xia et al., 2019). Par ailleurs, il a été montré sur des

foies chroniquement inflammés de patients atteints de stéatohépatite métabolique (MASH), que la population infiltrée de monocytes CD14^{high}CD16⁺ (proche de la population murine MoMF Ly6C^{high}) sécrètent des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , IL-1 β , le CCL1 et le CCL2 (Liaskou et al., 2013). De plus, des études menées *in vitro* ont montré le rôle important de l'inflammasome NLRP3 des KC, au cours de la MASH (Knorr et al., 2020). En effet, l'inflammasome NLRP3 est capable de détecter les augmentations des niveaux de céramides intracellulaires, de cristaux de cholestérol, de la teneur en acides gras saturés et en ROS et des niveaux d'ADNmt, liées à la lipotoxicité. Cette capacité de détection provoque l'induction de la caspase-1 dans les KC et mène ainsi à la production d'IL-1 β (Zannetti et al., 2016). De manière complémentaire, des modèles murins de MASH induite par une variété de régimes alimentaires (MCDD, HFD, régime athérogène), ont confirmé que l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les KC et la production d'IL-1 β qui en découle, exacerbent les réponses inflammatoires et augmentent le niveau d'IL-6 et de CCL2 ce qui favorise le recrutement des MoMF et des neutrophiles (Jin et al., 2020). Par ailleurs, il a été mis en évidence qu'un régime induisant une stéatohépatite métabolique provoquait des changements significatifs au niveau de l'expression génique des KC par l'intermédiaire d'une reprogrammation médiée par la signalisation LXR. Ces changements au niveau des KC engendrent notamment une perte partielle de leur identité ainsi qu'une augmentation de l'expression de TREM2 et CD9 (Seidman et al., 2020). L'augmentation de l'expression de TREM2 est fortement corrélée avec des scores de MASLD élevés et reflète également la sévérité de la stéatose, de l'inflammation, et de la ballonisation des hépatocytes (Xiong et al., 2019). En effet, des analyses de séquençage de l'ARN unicellulaire ont montré que des macrophages exprimant *Trem2* sont présents dans le foie sur les sites de lésions hépatocellulaires. Cependant, des analyses des profils transcriptomiques au cours de la stéatohépatite ont également reflété la dynamique des MoMF recrutés au niveau du foie à acquérir une expression accrue de Trem2 dans la circulation. Par ailleurs, des niveaux élevés de TREM2 soluble systémique chez la souris et les humains atteints de MASH ont été détectés (Hendrikx et al., 2022). Ainsi, les KC et les MoMF possèderaient toutes deux la capacité d'exprimer TREM2 au cours de la MASH. Bien que de nombreuses études révèlent que l'expression de TREM2 par les macrophages soit positivement corrélée à la MASLD, l'étude menée par Hou *et al.* décrit une coordination métabolique protectrice entre les mitochondries hépatocytaires et les macrophages exprimant TREM2. En effet, les macrophages déficient pour *Trem2* libèrent des exosomes qui altèrent la structure mitochondriale hépatocyttaire et l'approvisionnement en énergie en raison de leur teneur élevée en miR-106b-5p, qui bloque

Mfn2. A l'inverse, la surexpression de TREM2 dans les macrophages hépatiques a amélioré l'apport énergétique hépatique dans des modèles murins de MASH induite par l'alimentation (Hou et al., 2021). Ainsi la coordination métabolique médiée par TREM2 entre les macrophages et les hépatocytes semble limiter les dysfonctionnements hépatiques. Plus récemment, il a été montré que l'ostéopontine (OPN) dérivée des macrophages avait un rôle protecteur sur la MASH. Cette étude a démontré que les macrophages possédant une forte expression du gène de l'ostéopontine (*Spp1*) sont enrichis chez les patients et les souris atteints de stéatohépatite associée au métabolisme. Par ailleurs, le « Knock-In » conditionnel de *Spp1* dans les cellules myéloïdes ou les macrophages hépatiques (KC) confère une protection, tandis que l'inactivation de *Spp1* dans les cellules myéloïdes aggrave la MASH de souris nourries avec un régime riche en graisses, en fructose et en cholestérol (HFFC). L'effet protecteur de l'ostéopontine a été médié par l'induction de l'arginase-2 (ARG2), qui a augmenté l'oxydation des acides gras (FAO) dans les hépatocytes. L'induction de l'ARG2 provient de l'augmentation de la production d'oncostatine-M (OSM) dans les macrophages par l'intermédiaire de la signalisation STAT3. Ainsi l'amélioration du dialogue OPN-OSM-ARG2 entre les macrophages (MoMF et KC) et les hépatocytes semble être bénéfique pour les patients atteints de MASH et révèle un autre rôle protecteur de ces macrophages au cours de la MASH (Han et al., 2023).

De manière intéressante, des approches non biaisées à haut débit ont également révélé deux sous-populations de KC murines : les KC1 CD206^{low}ESAM⁻ et les KC2 CD206^{high}ESAM⁺. Cette seconde sous-population, KC2, présente une signature métabolique distincte, notamment par l'expression de l'un des principaux récepteurs de captation des lipides : CD36. Les KC2 semblent donc participer à la régulation du stress oxydatif hépatique associé à l'obésité. De plus, la déplétion des KC2 dans des modèles murins de MASH induits par l'alimentation, prévient le développement de la stéatose hépatique. Cette étude révèle ainsi l'existence d'une certaine hétérogénéité des KC, et décrit notamment une sous-population avec des fonctions métaboliques (Blériot et al., 2021). Dans des modèles de MASH, induite par régime alimentaire déficient en Méthionine et Choline (MCDD), une réduction du nombre de KC est observé durant les stades les plus précoces (Devisscher et al., 2017). Cependant, les MoMF qui sont recrutés au niveau du foie pourraient fortement contribuer au rétablissement de la population de macrophages hépatiques. En effet, après épuisement sélectif des KC exprimant le marqueur Clec4F, les MoMF recrutés vont être capables de se différencier en KC pleinement fonctionnels (Beattie et al., 2016; Scott et al., 2016). Plus récemment, il a été montré qu'au cours de la MASLD, les KC étaient remplacées par deux sous-populations de macrophages avec des états

d'activation distincts ressemblant soit à des KC homéostatiques, soit à des macrophages associés aux lipides (LAM) du tissu adipeux obèse. Les LAM hépatiques en question expriment un biomarqueur des patients atteints de MASH lié au développement de la fibrose : l'ostéopontine (OPN). De plus, ces LAM ont été retrouvés dans des zones du foie « fibrotiques » avec une importante expression de Desmine, caractéristique des cellules stellaires hépatiques et des myofibroblastes (Remmerie et al., 2020). Par ailleurs, au cours de la progression de la MASH vers un stade plus avancé comme la fibrose, les macrophages hépatiques pro-inflammatoires infiltrés MoMF Ly6C^{high}, vont se transdifférencier en une population de macrophages hépatiques anti-inflammatoires et réparateurs : les MoMF Ly6C^{low}. Cette différenciation va indiquer le passage d'une phase inflammation/blessure à une phase de résolution/réparation (Ramachandran et al., 2012; Wen et al., 2021).

- *Les neutrophiles*

Les neutrophiles ont un rôle bien établi dans les maladies alcooliques du foie (Gao et al., 2019) et pourraient également être des acteurs contribuant à l'apparition et à la progression de la MASH. En effet, le ciblage des neutrophiles (épuisement, inhibition de leur activité ou de leur recrutement) réduit l'inflammation hépatique dans des contextes d'obésité et de stéatohépatite métabolique (Ou et al., 2017). Afin d'étudier leur importance, les études expérimentales visent souvent à épuiser ces cellules par injection d'anticorps anti-Ly6G ou anti-Gr1. Cependant ces approches ne sont que partiellement efficaces et manquent de spécificité. En effet, il a été montré qu'après un traitement anti-Ly6G, les neutrophiles restants, ne se sont pas échappés de l'épuisement, mais sont plutôt nouvellement dérivés de la moelle osseuse. Par ailleurs, ces neutrophiles nouvellement générés ont une expression pour le marqueur Ly6G diminuée et deviennent par conséquent des cibles réduites pour l'épuisement médié par l'anticorps anti-Ly6G. Pour pallier à cette limitation, une étude a notamment développé une stratégie de déplétion à base d'un double anticorps : anticorps anti-Ly6G couplé avec un anticorps anti-rat IgG2a de souris, qui réduit spécifiquement et durablement l'élimination des neutrophiles (Boivin et al., 2020).

Il est important de noter que des études récentes ont noté des différences dans la biologie des neutrophiles entre les souris et les humains. En effet, les souris ont relativement moins de neutrophiles dans la circulation ($\pm 1 \times 10^9/L$) que les humains ($\pm 4 \times 10^9/L$) (M. Li et al., 2017; von Vietinghoff and Ley, 2008). De plus, les hépatocytes de souris stressés ont moins de capacité à recruter les neutrophiles que les hépatocytes humains puisque le gène *humain IL-8* n'a pas

d'équivalent chez la souris, et les hépatocytes de souris induisent la production de CXCL1 de manière beaucoup moins efficace que les hépatocytes humains lorsqu'ils sont exposés à des médiateurs inflammatoires (Hwang et al., 2020b). Ainsi il a été montré que la surexpression de *Cxcl1* dans les hépatocytes, induite par des adénovirus, chez les souris soumises à un régime HFD pendant 3 mois, favorise l'expression de chimiokines impliquées dans le recrutement des neutrophiles au niveau du foie (Hwang et al., 2020a). Dans cette même étude, l'infiltration des neutrophiles est également associée à une augmentation du stress oxydatif, par la production de ROS, et à l'activation de kinases associées au stress comme ASK1 ou la protéine kinase activée par les mitogènes p38 (p38MAPK). Ces kinases relaient le stress oxydatif à la signalisation de la mort cellulaire et par conséquent à la progression de la MASH. CXCL6 est une autre chimiokine qui recrute les neutrophiles en se liant à CXCR1 et CXCR2. En raison de la fonction partagée de CXCL6 et CXCL1, il est préférable de supposer que CXCL6 pourrait être également impliquée dans la pathogenèse de la MASH. Cependant, le rôle de CXCL6 dans la MASH reste encore à éclaircir. Un autre aspect intéressant à aborder est le rôle du miR223. En effet, plusieurs miR, dont miR-122, miR-192, miR-223, miR-21 et miR-29, affectent la pathogenèse de la MASLD *in vitro* et dans des modèles animaux expérimentaux (Calo et al., 2016; Cheung et al., 2008; Loyer et al., 2016; Pirola et al., 2015). De manière intéressante, miR-223 est caractérisé comme « LE » miR spécifique des neutrophiles, puisqu'il s'exprime aux niveaux les plus élevés dans les neutrophiles (Ye et al., 2018; Yuan et al., 2018). miR-223 est régulé à la hausse dans les hépatocytes de souris nourries au HFD et les patients atteints de MASH. D'un point de vue mécanistique, il a été rapporté que miR-223, abondamment exprimé par les neutrophiles, est transporté vers les hépatocytes par des vésicules extracellulaires (VE) dérivées des neutrophiles. Ce transfert est notamment médié par l'interaction entre le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR) dans les hépatocytes et l'apolipoprotéine E (APOE) présente dans les VE (He et al., 2021; Xiaolin Wang et al., 2021). En ce qui concerne le rôle de miR-223, il a été décrit comme capable de cibler plusieurs gènes dans les hépatocytes et les cellules stellaires hépatiques (HSC) qui inhibent le développement de la fibrose et par conséquent la progression de la MASH (Hou et al., 2021; Szabo, 2021). Par ailleurs, les neutrophiles, en tant que producteurs de l'enzyme lysosomale qui est la myéloperoxydase (MPO), pourrait favoriser directement les lésions hépatocytaires et l'activation des cellules étoilées hépatiques avec la sécrétion augmentée de MPO (Koop et al., 2020; Pulli et al., 2015). En effet, il a été montré qu'une carence en MPO pourrait empêcher le développement de la MASH chez la souris en atténuant les lésions hépatiques et la fibrose induites par un régime riche en graisses, en cholestérol et glucides (Koop et al., 2020). Par ailleurs, les pièges

extracellulaires des neutrophiles (NET : Neutrophil extracellular trap), connus pour limiter l'infection en piégeant les agents pathogènes, ont été associés à une inflammation stérile chronique et les niveaux circulants de marqueurs de NET augmentent chez les patients atteints de MASH. Enfin, l'inhibition de la formation de NET protège la souris de l'inflammation hépatique induite lors de la MASH (van der Windt et al., 2018). Une étude plus récente a mis en évidence une augmentation des marqueurs des NET (comme l'histone H3 citrullinée) dans le foie de patients atteints de MASH et que les NET corrélaient avec la gravité de la MASLD (Miele et al., 2021).

- *Les cellules dendritiques*

Les cellules dendritiques (DC) conventionnelles sont regroupées en 2 sous-populations : les cDC1 CD103⁺ et les cDC2 CD11b⁺. Ces deux sous-populations sont présentes dans le foie et se retrouvent accumulées au cours de la MASH. Actuellement, le rôle des cDC2 dans le MASH n'est pas encore élucidé, alors que des études sur les cDC1 ont toutefois été menées. Chez les patients atteints de MASH le nombre de cDC1 est augmenté et associé à une augmentation des caractéristiques de la MASH (Deczkowska et al., 2021; Haas et al., 2019). Les premières études menées sur des souris dépourvues de cDC1 (*Batf3-KO*) et nourries avec des régimes induisant une MASH (MCDD ou régime riche en sucrose), ont mis en évidence une augmentation de l'inflammation hépatique, et par conséquent une progression de la stéatose vers la MASH (Heier et al., 2017). Par ailleurs, le transfert adoptif de cDC1 CD103⁺ chez les souris *Batf3-KO* a inversé ce processus, suggérant ainsi que les cDC1 auraient un rôle protecteur. Cependant, une étude plus récente utilisant un modèle spécifique de délétion des cDC1 chez la souris, a montré des résultats diamétralement opposés, et suggèrent que les cDC1 auraient finalement un rôle pathogénique. En effet, cette étude utilise un modèle murin de déplétion génétique de cDC1 chez la souris, chez lesquelles l'activation du promoteur *Xcr1* conduit à l'expression de la recombinaise Cre, qui à son tour active l'expression de la toxine diphtérique A cytotoxique, conduisant à l'ablation complète des cellules exprimant *Xcr1* (Deczkowska et al., 2021). L'ensemble de ces données suggèrent un rôle clé des cellules cDC1 dans la pathologie hépatique, et notamment via leur rôle classique en tant qu'activateurs des lymphocytes T dans la MASH. A l'heure actuelle, des recherches plus approfondies sont nécessaires pour mieux appréhender le rôle des DC dans la pathogenèse de la MASLD.

- *Les lymphocytes T et lymphocytes B*

De plus en plus d'études indiquent que les lymphocytes T, les lymphocytes B et les lymphocytes T non conventionnels jouent un rôle essentiel dans la MASH (Barrow et al., 2021). Il a notamment été montré que le développement des caractéristiques de la MASH chez des souris nourries avec un régime inducteur de MASH nécessite des lymphocytes T conventionnels. En effet, les niveaux d'alanine aminotransférase (ALT) ainsi que l'analyse histologique du foie chez des souris dépourvues des gènes codant pour le récepteur des lymphocytes T (TCR) β et le TCR δ étaient normaux (Dudek et al., 2021). Par la suite, la même étude a phénotypé les lymphocytes T et a révélé une augmentation des lymphocytes T CD8 hépatiques qui expriment le récepteur des chimiokines CXCR6 chez les souris ayant développé une MASH. CXCR6 est caractérisé comme le marqueur des lymphocytes T CD8 résidents du foie. Un grand nombre des lymphocytes T CD8 CXCR6 identifiés, sont répartis dans le foie et coexpriment des marqueurs associés à l'épuisement comme PD1, aux réponses effectrices comme le Granzyme B, le TNF α et l'IFN γ et à l'apoptose. Cependant ces lymphocytes n'expriment aucun marqueur lié à la prolifération (Ki67) ou la survie (Bcl2). Par ailleurs, les lymphocytes T CD8 CXCR6 hépatiques sont également caractérisés par une faible activité du facteur de transcription FOXO1. D'un point de vue mécanistique, il semblerait qu'en réponse à l'IL-15, une régulation négative de FOXO1 s'opère pour laisser place à une régulation positive de CXCR6, ce qui a permis aux cellules T CD8 CXCR6 de devenir sensibles aux stimuli métaboliques (acétate et l'ATP extracellulaire) et d'être capables de déclencher collectivement « une auto-agression ». Par ailleurs, les lymphocytes T CD8 CXCR6 du foie de souris ou de patients atteints de MASH présentent des signatures transcriptionnelles similaires et ont montré une destruction « auto-agressive » des hépatocytes d'une manière indépendante du CMH de classe I après signalisation par les récepteurs purinergiques P2X7. C'est donc cette activité de destruction non spécifique des lymphocytes T CXCR6 CD8 qui est appelée : « auto-agression ». Ces cellules acquièrent alors le statut de lymphocytes auto-agressifs dont le mode d'action diffère fondamentalement de celui des cellules spécifiques à l'antigène (Dudek et al., 2021). Par ailleurs, dans l'étude publiée par Lacotte *et al.* l'utilisation d'un anticorps anti-CD122 dans un modèle de MASH, qui bloque notamment la signalisation de l'IL-15 et les précurseurs des lymphocytes T CD8, entraîne une réduction du nombre de lymphocytes T CD8 CXCR6 auto-agressifs, restaure l'activité CD8 spécifique et réduit la croissance du CHC par rapport aux souris MASH non traitées (Lacotte et al., 2023). Une seconde étude, a également révélé le rôle important de ces lymphocytes T auto-agressifs dans l'induction de la MASH et surtout la progression vers le CHC (Pfister et al., 2021). Dans cette étude, une méta-analyse de

trois essais cliniques de phase III qui ont testé des inhibiteurs de PDL1 ou PD1 chez plus de 1600 patients atteints de CHC avancé, a révélé que l'immunothérapie n'améliorait pas la survie chez les patients atteints de CHC non viral. Ces résultats ont été validés dans deux autres cohortes de patients atteints de CHC induits par la MASH. Collectivement, ces données semblent indiquer que le CHC non viral (MASH-CHC), pourrait être moins sensible à l'immunothérapie, probablement en raison de l'activation aberrante des lymphocytes T auto-agressifs au cours de la MASH qui causent des lésions tissulaires importantes et qui sont responsables d'une altération de la surveillance immunitaire (Pfister et al., 2021). En ce qui concerne les lymphocytes T CD8 fonctionnant « classiquement », ils sont notamment activés par les signaux IFN de type 1 et les antigènes intestinaux et sécrètent des cytokines comme l'IFN γ et le TNF α ce qui va favoriser la MASH (Wolf et al., 2014). Il a été montré qu'une déplétion des lymphocytes T CD8 entraînait une restauration de la sensibilité à l'insuline (Ghazarian et al., 2017), une diminution des lésions hépatiques ainsi qu'une réduction de la fibrose (Bhattacharjee et al., 2017; Wolf et al., 2014). Plus récemment, une étude a généré un modèle murin de CHC inductible exprimant les antigènes OVA pour étudier la réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'antigène tumoral. Pour cela, des cellules Hep55.1c-Tet3G-LucOS ont été générées et transférées dans le foie de souris C57BL/6. L'expression de l'antigène OVA tumoral a été induite par l'utilisation de doxycycline (dox) supplémentée dans l'eau de boisson et les souris ont également été mises sous régime MCDD (Methionine Choline Deficient Diet) afin de générer un environnement de MASLD. Ce système s'est avéré être un moyen efficace d'étudier les lymphocytes T spécifiques de l'antigène tumoral dans un environnement de MASLD. A travers ce modèle, il a été constaté que la MASLD altère l'immunité et la réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'antigène contre le CHC. Cependant, il s'est révélé que cet effet n'était pas dû à des changements fonctionnels intrinsèques des lymphocytes T CD8, mais à l'accumulation de macrophages dans l'environnement hépatique qui venaient entraver l'immunité antitumorale spécifique de l'antigène (McVey et al., 2022).

En ce qui concerne le rôle des lymphocytes T CD4, la MASH va favoriser leur polarisation vers des sous-ensembles de lymphocytes Th17 sécrétant de l'IFN γ et de l'IL-17, ce qui accélère la MASH ainsi que sa progression vers de stades plus avancés (Rau et al., 2016). Plus récemment, de nouvelles preuves sont venues suggérer une contribution importante des cellules Th17 à la pathogenèse de la MASLD (Moreno-Fernandez et al., 2021). En effet, une population bien distincte de Th17 a été identifiée et caractérisée comme des cellules inflammatoires hépatiques

Th17 exprimant CXCR3 (ihTh17). L'accumulation de ces cellules serait cependant dépendante du microenvironnement hépatique et de l'activation de l'axe CXCR3. Le potentiel inflammatoire/pathogène des cellules ihTh17 est associé à l'activité glycolytique et à la production d'IFN γ et de TNF α . Les données ayant été retrouvées chez la souris, englobant les caractéristiques des cellules ihTh17, l'activation de l'axe CXCR3, et l'implication de la voie glycolytique, ont également été retrouvées dans la MASLD humaine. Cette étude révèle donc que le microenvironnement hépatique stéatotique est impliqué dans la régulation de l'accumulation, du métabolisme, et de l'activité des cellules Th17 en vue de les faire devenir des ihTh17 (Moreno-Fernandez et al., 2021). Lorsque l'on fait le bilan des études qui s'intéressent au rôle des lymphocytes T au cours de la MASLD, les modèles les plus fréquemment utilisés reposent sur l'utilisation d'un modèle d'induction de tumeurs chez la souris combiné avec un régime permettant le développement de la MASLD. L'un de ces modèles a notamment mis en évidence que la dérégulation du métabolisme lipidique qui a lieu au cours de la MASLD entraînait une perte sélective des lymphocytes T CD4 intrahépatiques. En effet, l'acide linoléique, acide gras s'accumulant au cours de la MASH, impacte directement la fonction mitochondriale des lymphocytes T CD4 et par conséquent génère plus de dommages oxydatifs (production de ROS), qui mènent à la perte sélective des lymphocytes T CD4 intrahépatiques et ce qui favorise l'hépatocarcinogénèse (Ma et al., 2016). Cependant, l'étude de stades plus précoces de la MASLD, en s'affranchissant de l'induction de tumeurs chez la souris et se basant uniquement sur l'utilisation de régimes inducteurs de MASH, a mis en avant l'implication des lymphocytes T CD4 dans le développement de la fibrose hépatique chez des souris humanisées. En effet, des souris immunodéficientes greffées avec des cellules immunitaires humaines ont été mises sous régime riche en graisses et en calories pendant 20 semaines. Ces souris ont développé une stéatose, une inflammation et une fibrose hépatique. Par ailleurs, le nombre de lymphocytes T CD4 mémoires et effecteurs humains a augmenté dans le foie et dans la circulation des souris. Une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ et l'IL-17A a également été détectée. Cependant, l'utilisation d'anticorps anti-CD4 humain, permettant l'épuisement spécifique des lymphocytes T CD4 humains, a réduit l'inflammation hépatique et la fibrose sans pour autant influencer la stéatose (Her et al., 2020). Bien que dans l'ensemble, les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle essentiel dans l'inflammation et la fibrose liée à la MASH, les mécanismes de chaque sous-ensemble de lymphocytes T CD4 dans l'apparition et la progression de la MASH peuvent possiblement

varier (Y. Zhou et al., 2022). Pour des questions de synthèse, leurs rôles sont résumés dans la **Table 2** de ce manuscrit.

Cell subset	Effect	Mechanism
Th1 cells	Profibrotic	IFN- γ dependent manner
Th2 cells	Complicated	Production of type 2 cytokines <i>via</i> IL-33
Th17 cells	Profibrotic	An IL-17-driven fibrotic process
Th22 cells	Bidirectional	Production of IL-22
Treg cells	Antifibrotic(mainly)	Immunosuppression by secretion of IL-10

Tableau 2. Récapitulatif des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 au cours de la MASLD.

Les cellules Th1 et Th17 sont pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques, tandis que le rôle des cellules Th2 reste encore compliqué à déterminer. Les cellules Th22 et Treg peuvent être à la fois anti et/ou pro-fibrotiques en fonction du contexte et du stade la maladie.
(Extrait de Zhou et al., 2022)

Les lymphocytes T doubles négatifs (DNT) sont un sous-ensemble unique de lymphocytes T qui n'expriment pas les marqueurs CD4 et CD8. Le rôle des cellules DNT au cours de la MASLD reste largement inconnu bien que leur proportion générale intrahépatique soit significativement augmentée et corrélée avec une élévation de l'IL-17A chez les souris nourries avec un régime MCDD. De manière plus précise, la proportion de cellules DNT TCR $\gamma\delta$ intrahépatiques est augmentée avec une élévation de l'IL-17A, mais la proportion de cellules DNT TCR $\alpha\beta$ est diminuée avec une réduction du granzyme B. Des études ayant déplété les cellules DNT TCR $\gamma\delta$ ont montré une baisse des taux hépatiques d'IL-17A et une réduction de la MASLD. En revanche, le transfert adoptif de cellules DNT TCR $\alpha\beta$ de souris témoins a augmenté l'apoptose intrahépatique des lymphocytes T CD4 et CD8 et limité la progression de la MASLD. La disparition des cellules DNT TCR $\alpha\beta$, observée au cours de la MASLD, pourrait s'expliquer par leur entrer en apoptose, induite par deux acides gras présents en quantité importante au cours de la MASH : l'acide adrénique et acide arachidonique. En parallèle l'acide arachidonique faciliterait la sécrétion d'IL-17A par les cellules DNT TCR $\gamma\delta$ favorisant la voie de signalisation NF- κ B et par conséquent l'inflammation hépatique (Li et al., 2022). Par ailleurs, le relargage d'endotoxines associé à l'obésité peut également entraîner l'expansion des cellules T $\gamma\delta$ hépatiques qui vont à leur tour produire de l'IL-17 (F. Li et al., 2017). Les cellules NKT recrutées, vont également avoir un rôle important dans la MASH, notamment par la

production de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ) mais vont également participer à la progression vers des stades plus avancés comme la fibrose en jouant un rôle important dans l'activation des HSC (OPN, Sonic Hedgehog) (Maricic et al., 2018).

Les études abordant le rôle des lymphocytes B intrahépatiques dans les MASLD restent encore limitées. Certaines études ont mis en évidence sur des souris nourries sous HFD, une accumulation accrue de cellules B qui expriment d'importantes quantités de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF α) et ont une capacité plus élevée à activer les cellules T et plus particulièrement la réponse Th1 (Zhang et al., 2016). Chez l'Homme, une augmentation des niveaux sériques du facteur d'activation des cellules B (BAFF : B-cell Activating factor) est corrélée à la ballonisation des hépatocytes ainsi qu'à la fibrose chez des patients MASH (Miyake et al., 2013). Au niveau hépatique, des lymphocytes B ont été trouvés dans des agrégats riches en lymphocytes T. Cette infiltration de lymphocytes B est associée à des taux élevés d'IFN γ , à une inflammation et une fibrose lobulaire (Bruzzi et al., 2018). Plus récemment, des souris dépourvues de lymphocytes B (souris JHT) et des souris ayant des lymphocytes B avec des fonctions restreintes dans la production d'anticorps (souris IgMi), se sont montrées toutes deux protégées contre la prise de poids induite par un régime riche en graisses, la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique. Cependant, les souris IgMi atténuent ces phénotypes à une intensité plus élevée que les souris JHT. Ces résultats s'expliquent par le fait que les souris IgMi ont un développement normal de lymphocytes B. Ainsi ces lymphocytes B, même s'ils ne sont plus en mesure de produire des anticorps solubles, peuvent toujours sécréter des cytokines. A l'inverse les souris dépourvues de lymphocytes B, ne peuvent produire ni d'anticorps solubles, ni de cytokines. Ainsi ces résultats démontrent que les cytokines produites à partir des lymphocytes B peuvent jouer un rôle potentiellement protecteur au cours de la MASLD, alors que les anticorps solubles sembleraient aggraver la pathologie (Karl et al., 2022).

- *Les lymphocytes T non conventionnels*

Il a été montré que le nombre de cellules iNKT augmente chez les patients atteints de MASH ainsi que chez la souris (Syn et al., 2012, 2010). Des modèles murins déficients pour les cellules iNKT (*CD1d-KO* or *Traj18-KO*) ont été utilisés par plusieurs études afin de mettre en évidence l'implication de ces cellules dans l'induction des lésions hépatiques et le développement d'une cirrhose (Bhattacharjee et al., 2017; Maricic et al., 2018; Syn et al., 2012; Wolf et al., 2014). Par ailleurs, la régulation à la hausse de l'OPN, médiée par les cellules iNKT, favoriserait la fibrogenèse (Syn et al., 2012).

Dans des cas de lésions hépatiques induites par le tétrachlorure de carbone (CCL4), les cellules MAIT seraient impliquées dans l'aggravation de l'inflammation et de la fibrose hépatique de patients atteints de MASH (Hegde et al., 2018). Cependant, des études menées chez la souris ont montré que les MAIT auraient un rôle protecteur en régulant la polarisation des macrophages (Li et al., 2018). Dans le foie de patients atteints de cirrhose, les cellules MAIT s'accumulent dans les cloisons fibrotiques. Leur rôle profibrogénique a été démontré dans des modèles murins dans lesquels la déficience en *Mr1* (inhibition des MAIT) a conduit à une résistance à la fibrose induite par CCL4 ou par ligature des voies biliaires (Hegde et al., 2018; Toubal et al., 2019). Le rôle concret des MAIT au cours de la MASLD reste encore controversé au vu des divergences entre modèles.

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ intrahépatiques voient leur nombre augmenté au cours de la MASH. Ces cellules favoriseraient le développement de lésion hépatiques (F. Li et al., 2017). Par ailleurs, le développement des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans le foie est également impacté chez les souris *CD1d-KO*, ce qui pourrait contribuer à atténuer le phénotype de la MASH observé chez ces souris (Syn et al., 2012).

d) De la fibrose à la cirrhose

La fibrose est une réponse générée par des lésions chroniques du foie provoquées par différents facteurs comme les hépatites virales, la consommation d'alcool ou encore la MASH. Au cours de la MASH, une boucle se met en place entre mort cellulaire et inflammation chronique entraînant de nombreuses lésions au niveau hépatique. Le foie va alors tenter de réparer son architecture et ses fonctions en régulant à la hausse les composants de la matrice extracellulaire (collagène, élastine...) et en favorisant la régénération des hépatocytes. En effet, afin de remplacer les hépatocytes ayant été endommagés, une cicatrice fibreuse se forme, c'est ce que l'on appelle la fibrose hépatique (Roehlen et al., 2020).

De manière plus précise, le recrutement des cellules immunitaires, suite au relargage de cytokines et de chimiokines par les cellules hépatiques, au cours de la MASH favorise la transdifférenciation des HSC en myofibroblastes, producteurs de collagène (Heyens et al., 2021; Roehlen et al., 2020). Habituellement, on retrouve ce mécanisme dans des réparations du tissu lors d'une blessure à court terme. Lorsque les lésions hépatiques s'accumulent sur le long terme, les HSC sont constamment activées et vont donc quitter leur phénotype de cellules

quiescentes pour obtenir celui de myofibroblastes prolifératifs, contractiles et producteurs de collagène (Affo et al., 2017). L'accumulation de collagène s'accompagne d'une augmentation de métalloprotéinases (MMP) comme le MMP-9 qui décompose les produits de la matrice extracellulaire (Arthur, 2000; Roderfeld, 2018). Normalement, les MMP sont contrôlées par des inhibiteurs tissulaires de la métalloprotéinase (TIMP) (Robert et al., 2016). Dans les foies fibrotiques murins, des concentrations élevées de TIMP-1 ont été trouvées ce qui engendrent une perturbation de l'équilibre MMP/TIMP (Yoshiji et al., 2000). Ce déséquilibre va provoquer une augmentation de l'accumulation de matrice extracellulaire (ECM) et donc de la fibrogenèse (**Figure 8**). En plus des produits de la ECM, les myofibroblastes synthétisent également de l'actine du muscle lisse α (α -SMA), marqueur clé de l'activation des HSC. Certaines voies de signalisation sont associées à l'activation des HSC et à la progression de la fibrose : comme la voie du TGF β , la voie PDGF, l'inflammasome NLRP3 et la voie des WNT/ β -caténine (Miao et al., 2013; Roehlen et al., 2020).

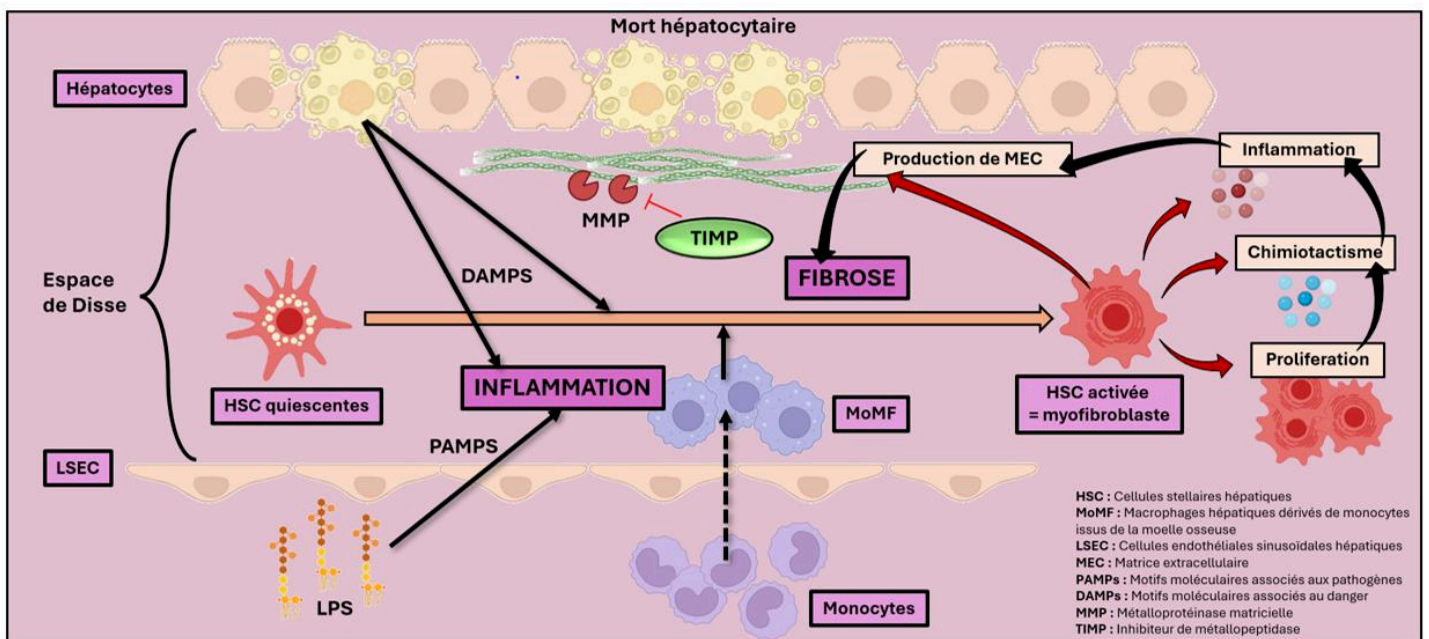


Figure 8. Mécanisme d'activation des cellules stellaires hépatiques et mise en place de la fibrose hépatique.

L'accumulation des lésions hépatiques et de l'état inflammatoire chronique du foie entraînent l'activation des cellules stellaires hépatiques en myofibroblastes prolifératifs, contractiles et producteurs de collagène. L'accumulation de collagène s'accompagne d'une augmentation des métalloprotéinases qui décomposent la matrice extracellulaire. Dans les foies fibrotiques murins, des concentrations élevées d'inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMP) sont détectées, ce qui engendre une perturbation de la balance MMP/TIMP. (Adaptée de Yan et al., 2021)

La progression de la fibrose hépatique vers la cirrhose du foie varie notamment en fonction des facteurs environnementaux (Zhou et al., 2014). La cirrhose est la conséquence d'une fibrogenèse « de longue date » qui génère l'encapsulation du parenchyme hépatique lésé par une cicatrice de collagène. Histologiquement, la cirrhose se caractérise par des cloisons fibreuses (septa) qui relient les espaces portaux entre eux et avec les veines centrolobulaires, ce qui a pour conséquence d'isoler les hépatocytes de la veine centrale. Les changements qui vont s'opérer au niveau de la structure du foie mènent à une augmentation de la résistance intravasculaire dans le système porte et à une diminution de la perfusion hépatique, ayant pour conséquence une perte de la fonction hépatique (Schuppan and Afdhal, 2008). Enfin, au sein du parenchyme cirrhotique, des nodules dysplasiques peuvent apparaître, et certains d'entre eux évolueront vers un CHC (Heyens et al., 2021).

e) Le Carcinome hépatocellulaire (CHC)

Le carcinome hépatocellulaire est la forme la plus courante de tumeur maligne primitive du foie. Le CHC a recensé à l'échelle mondiale 906 000 nouveaux cas et 830 000 décès en 2020, ce qui le place au 6^{ème} rang des cancers les plus diagnostiqués et au 3^{ème} rang des causes de décès par cancer (Sung et al., 2021). Actuellement, les facteurs de risque courants sont les infections chroniques par le virus de l'hépatite B (VHB) et l'hépatite C (VHC), et la consommation d'alcool (Llovet et al., 2021; Mittal and El-Serag, 2013). Cependant, avec une augmentation de la prévalence des facteurs de risque métabolique du CHC (syndrome métabolique, obésité, diabète de type II et la stéatose hépatique non alcoolique (MASLD), est en train de devenir la principale cause de CHC dans le monde dans un avenir proche (McGlynn et al., 2021). Le CHC se développe dans un contexte de maladies hépatiques chroniques et de cirrhose qui implique un processus complexe en plusieurs étapes. Dans le foie cirrhotique, le CHC commence par la présence de nodules cirrhotiques pré-cancéreux appelés nodules dysplasiques de bas grade. Ces nodules peuvent se transformer en nodules dysplasiques de haut grade, et à leur tour, en CHC de « stade précoce » qui peut ensuite évoluer vers un CHC « avancé » (Cucarull et al., 2022). Le microenvironnement tumoral (TME) est considéré comme jouant un rôle fondamental dans toutes les étapes de la cancérogenèse. Le CHC a un milieu inflammatoire dû à la MASLD ou la MASH. Le microenvironnement tumoral est directement impliqué dans la modulation de la fibrose hépatique, le processus d'hépatocarcinogenèse et la transition épithélio-mésenchymateuse, l'invasion et les métastases (Novikova et al., 2017). Les

facteurs de croissance, les cytokines, les chimiokines, les métalloprotéinases, les miARN et les facteurs angiogéniques interviennent dans le dialogue entre les cellules tumorales, les cellules endothéliales, les cellules stellaires, les fibroblastes, les macrophages et d'autres cellules immunitaires comme les cellules NK (Cucarull et al., 2022). Ces interactions favorisent la croissance tumorale, la néovascularisation, l'invasion et l'immunosuppression.

f) Synthèse des mécanismes physiopathologiques de la MASLD

En résumé, dans des contextes d'obésité l'insulino-résistance va induire au niveau du tissu adipeux une importante lipolyse qui va favoriser le relargage d'acides gras libres dans la circulation. Ces acides vont alors affluer jusqu'au foie, où ils seront captés par les hépatocytes sous forme de triglycérides après estérification. L'accumulation d'acides gras dans le foie génère une lipotoxicité ainsi qu'un stress chronique oxydatif et du réticulum endoplasmique, engendrant une mort hépatocytaire. La souffrance et la mort des hépatocytes activent alors le système immunitaire hépatique suite à un relargage de DAMPs, de corps apoptotiques et de facteurs pro-inflammatoires (VE, cytokines et chimiokines). Un recrutement leucocytaire provenant de la circulation s'opère et les cellules recrutées (monocytes, neutrophiles, cellules NK, lymphocytes) participent activement à la mise en place de la réponse inflammatoire. En parallèle, l'obésité va fortement impacter l'intestin avec une modification du microbiote intestinal et une augmentation de la perméabilité ce qui va provoquer le relargage de produits bactériens (PAMPs, Lipopolysaccharides (LPS)) dans la circulation. Ces produits bactériens vont affluer jusqu'au foie pour participer à l'activation du système immunitaire hépatique. L'accumulation de ces phénomènes (chronicité) favorise la mise en place d'une inflammation et sur le long terme entraîne l'activation des cellules stellaires hépatiques en myofibroblastes, favorisant le développement d'une fibrose hépatique (**Figure 9**).

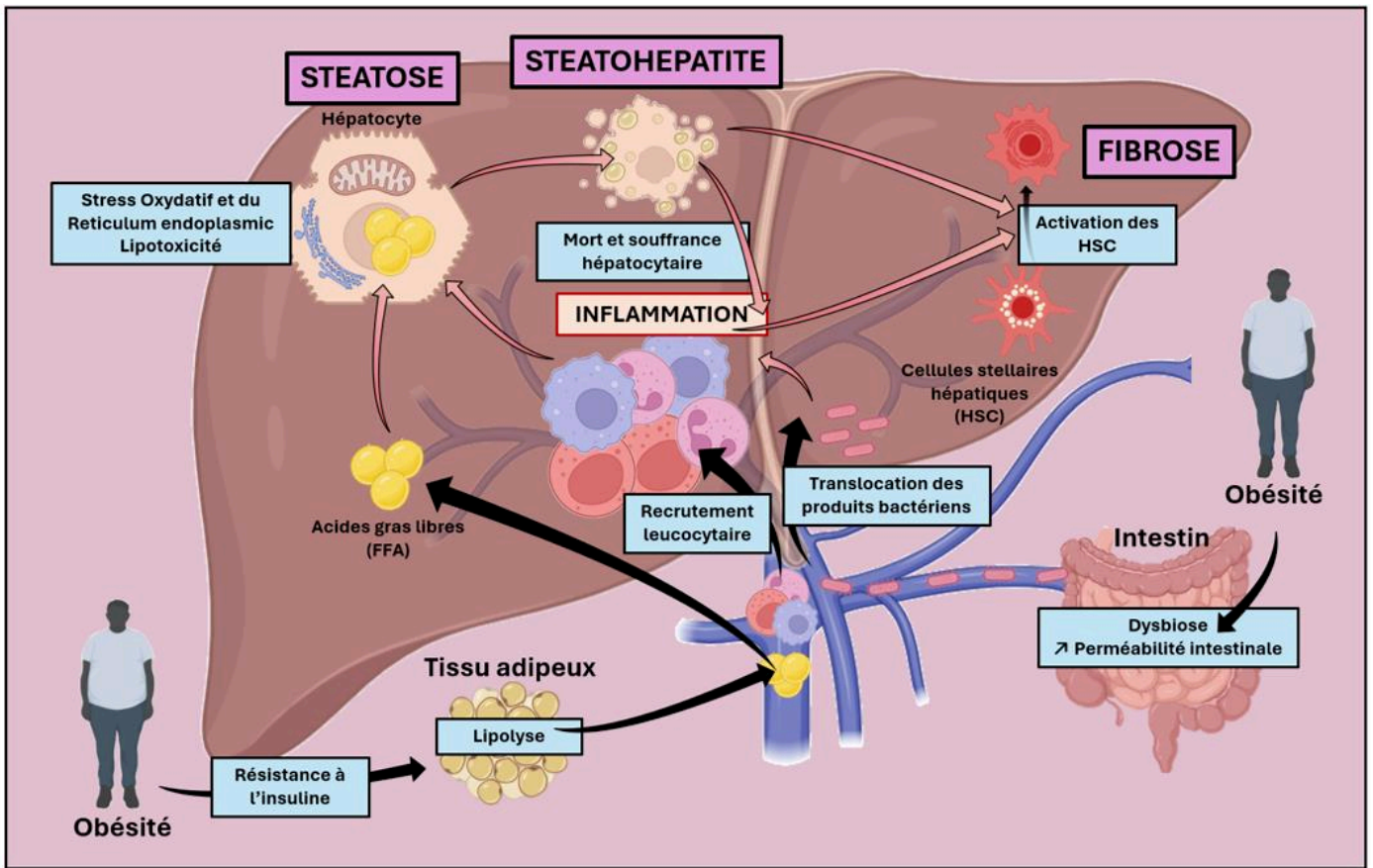


Figure 9. Schéma récapitulatif des différents mécanismes intra- et extra- hépatiques de la physiopathologie de la MASLD.

g) Modèles expérimentaux

De nombreux modèles de rongeurs différents ont été développés pour élucider la physiopathologie de la MASLD/MASH. A ce jour aucun modèle de rongeur ne peut présenter à lui seul l'ensemble du spectre de la maladie et les caractéristiques métaboliques associées à la MASH humaine, mais ces modèles peuvent cependant imiter des caractéristiques bien particulières. Dans cette partie, je vais donc passer en revue les modèles de rongeurs diététiques, génétiques et chimiques les plus couramment utilisés par mimer la MASLD (Zhong et al., 2019).

i. Les Modèles diététiques

▪ *Le régime riche en graisses (High Fat Diet HFD)*

Ce régime est utilisé pour générer des modèles d'animaux de MASLD. Le teneur de ce régime varie entre 45 et 75kcal% (Jacobs et al., 2016). Des rats nourris en utilisant ce régime (où 71% des calories proviennent des graisses, 11% des glucides et 18% des protéines) ont développé une résistance à l'insuline, une stéatose marquée, une inflammation ainsi qu'une fibrogenèse (Lieber et al., 2004). Par ailleurs, d'autres études menées sur la souris ont montré des résultats similaires après 16 semaines de régime (Santhekadur et al., 2018). Dans l'ensemble, le modèle HFD présente des caractéristiques similaires à celles de la MASH chez l'Homme, mais la conséquence pathologique hépatique n'est pas grave. Plus récemment, un nouveau modèle diététique de NASH a été développé : STHD-01 pour « Steatohepatitis-inducing HFD » (Ejima et al., 2016). Ce régime a une teneur en cholestérol de 5% et une teneur en gras de 40%, ce qui le rend extrêmement riche en acides gras saturés et cholestérol. Après avoir reçu le STHD-01 pendant 1 semaine, les souris normales (C57BL/6J) présentaient des marqueurs élevés de stéatose hépatique, y compris les triglycérides hépatiques et les niveaux d'ALT. Après 36 semaines de régime, l'apparition supplémentaire d'une fibrose et la formation de tumeurs bénignes ont été observées. Par ailleurs, ils ont également constaté que ce régime augmentait le potentiel tumorigène du diéthylnitrosamine (DEN), ce qui fait de ce régime un modèle intéressant notamment pour la fibrose et la formation de tumeurs. Il est tout de même important de préciser que les résultats varient selon les espèces et les souches utilisées. Les rats semblent notamment être plus sensibles à l'HFD que les souris, ce qui se traduit par un temps de régime plus court pour induire une manifestation plus sévère chez les rats.

- *Le régime riche en fructose*

La consommation en fructose favorise la lipogenèse *de novo*, le stress oxydatif et la résistance à l'insuline (Longato, 2013). Par ailleurs, l'ingestion de fructose favoriserait la prolifération bactérienne intestinale ainsi qu'une augmentation des niveaux d'endotoxines dérivées de l'intestin et par conséquent le développement d'inflammation hépatique (Ninomiya et al., 2012). Comparé au saccharose et au glucose, le fructose induit une plus grande accumulation de graisses hépatiques (Bergheim et al., 2008). De manière générale, l'apport en fructose se fait dans l'eau de boisson des souris. Les souris nourries avec de l'eau potable enrichie à 30% de fructose voient leur taux de triglycérides hépatiques, leur poids corporel et leur stéatose augmentés de 3 à 4 fois (Spruss et al., 2009). Kohli *et al.* ont nourri des souris C57BL/6 avec un régime riche en graisses et en glucides combiné à une eau de boisson enrichie avec 55% de fructose. Après 16 semaines de régime, ces souris ont développé un phénotype d'obésité, une résistance à l'insuline ainsi qu'une MASH fibrosante. Une augmentation du stress oxydatif hépatique, une infiltration de macrophages et le développement d'une fibrose ont été constatés par rapport à des souris nourries uniquement avec de l'HFD (Kohli et al., 2010). L'ajout de fructose dans un régime alimentaire riche en graisses permet donc d'obtenir un phénotype hépatique de la NASH plus robuste. Cependant, la stricte utilisation du fructose dans l'eau de boisson *ad libitum* ne suffit pas à l'obtention de ce phénotype.

- *Le régime enrichi en cholestérol et cholate*

L'utilisation de régime à base de cholestérol (1,25%) et de cholate (0,5%) a été décrite pour induire la formation progressive de stéatose, d'inflammation et de fibrose sur une période de 6 semaines (stéatose et inflammation) à 24 semaines (ballonnement hépatocytaire et fibrose) (Matsuzawa et al., 2007). Le cholestérol va rendre le foie sensible à la stéatohépatite induite par le facteur de nécrose tumorale (Fas) et la présence d'acide cholique va favoriser l'absorption du cholestérol et des graisses tout en bloquant la transformation du cholestérol en acides biliaires (Marí et al., 2006). Ainsi, le cholestérol ne peut être éliminé et voit son taux augmenté. L'utilisation de ce régime reproduit également des caractéristiques physiopathologiques de la MASH humaine comme la dyslipidémie et l'activation des cellules stellaires hépatiques. Cependant, le statut métabolique diffère de celui de la MASH humaine puisque les souris voient leur poids corporel diminuer de 9%, ainsi qu'un taux de triglycérides diminué comparé à celui de souris mises sous nourriture standard.

- *Le régime déficient en méthionine et choline (MCDD)*

Le régime déficient en méthionine et en choline (MCDD) a une teneur élevée en saccharose (40%) et une teneur modérée en matière grasse (10%), mais présente une déficience en méthionine et en choline qui sont des nutriments essentiels à la β -oxydation hépatique et à la production de VLDL (Ibrahim et al., 2016). La carence en choline entraîne une altération de la sécrétion hépatique des VLDL, ce qui engendre une accumulation de lipides hépatique et par conséquent un stress oxydatif aboutissant à des lésions hépatiques. L'un des avantages considérables de ce régime est le développement des caractéristiques histologiques de la MASH dans un temps d'alimentation court comparé aux autres modèles alimentaires. Le stade de la stéatose est atteint après 2 semaines de régime, le stade la MASH après 4 semaines et la fibrose après 7 semaines (Takahashi and Suzuki, 2012). Néanmoins, le modèle MCD ne présente pas les caractéristiques métaboliques de la MASH humaine, notamment le développement d'une obésité, une résistance à l'insuline périphérique, et une hyperlipidémie. Ainsi, ce modèle se voit plus particulièrement adapté pour étudier les événements intrahépatiques de la stéatohépatite. Par ailleurs, pour pallier ce défaut du métabolisme, l'ajout d'un régime MCDD à des souris ob/ob ou db/db est fréquemment réalisé.

- *Le régime alimentaire CDAA (choline-déficient L-amino-défini)*

Le régime CDAA est proche du régime MCD en raison de la déficience en choline qu'ils ont en commun. Les protéines sont cependant remplacées par un mélange équivalent et correspondant à des L-acides aminés (Nakae et al., 1995). Tout comme le régime MCD, il inhibe l'oxydation des acides gras dans les hépatocytes, augmente la synthèse des lipides, le stress oxydatif et l'inflammation, entraînant le développement d'une fibrose hépatique (Ibrahim et al., 2016). Cependant, ce régime nécessite un temps plus long pour que les changements histologiques de la MASH se mettent en place. Les souris sous régime CDAA ne présentent pas de résistance hépatique à l'insuline, et ne voient pas leur masse corporelle augmentée (Hebbard and George, 2011). Par conséquent, ce régime ne peut être utilisé pour examiner le profil métabolique de la maladie à moins qu'il ne soit combiné à d'autres régimes comme l'HFD.

ii. Modèles génétiques

A ce jour il existe de nombreux modèles génétiques pour mieux comprendre la MASH. Ces modèles ont le plus souvent une caractéristique commune puisque les altérations génétiques conduisent à une accumulation importante de lipides hépatiques sans inflammation ni fibrose évidente. Il est donc fréquent de mettre ces souris génétiquement modifiées sous l'un des régimes alimentaires précédemment décrits afin de développer les caractéristiques histopathologiques et biochimiques de la MASH. Ces modèles génétiques peuvent être regroupés selon 3 aspects : la synthèse des graisses, le transport des graisses hépatiques et l'oxydation des lipides.

▪ *Favoriser la synthèse des graisses*

Les souris ob/ob (déficience en leptine) présentent une mutation spontanée du gène de la leptine ce qui rend les souris déficientes en leptine. Le gène *ob* produit normalement l'hormone appelée leptine qui est produite principalement par le tissu adipeux. L'un des rôles de la leptine est de réguler l'appétit en signalant au cerveau que l'animal a assez mangé. Etant donné que la souris ob/ob n'est pas en mesure de produire de la leptine, sa prise alimentaire devient incontrôlée et la prise de poids inévitable. Ces souris, obèses, inactives et hyperphagiques présentent une hyperlipidémie, une hyperglycémie ainsi qu'une résistance à l'insuline. Les souris ob/ob développent une stéatose hépatique mais évoluent rarement vers des lésions hépatiques sévères ou une MASH. Par conséquent, un stimulus supplémentaire est nécessaire (MCDD, HFD...) pour induire les caractéristiques de la MASH (Lindström, 2007).

Les souris db/db présentent une mutation spontanée dans le gène du récepteur à la leptine qui entraîne une signalisation défectueuse de la leptine. Ces souris sont très similaires aux souris ob/ob et ont également besoin d'un stimulus supplémentaire (MCDD, HFD...) (Ibrahim et al., 2016).

Les souris déficientes pour l'homologue de la phosphatase et de la tensine (**PTEN**) développent spontanément une stéatose, une stéatohépatite et une fibrose (Nagaya et al., 2008). PTEN joue un rôle à la fois dans la croissance cellulaire, mais également dans la signalisation métabolique. Une carence en PTEN entraîne, une augmentation de la masse corporelle, une hypersensibilité à l'insuline hépatique avec une diminution de la glycémie à jeun (Kurlawalla-

Martinez et al., 2005). L'augmentation de la masse corporelle est due à une augmentation de l'adiposité sans modification correspondante de la répartition des graisses (Pal et al., 2012).

Les souris transgéniques SREBP-1c surexpriment la protéine de liaison aux éléments régulateurs des stérols 1c (SREBP-1c) et développent une stéatose, une stéatohépatite ainsi qu'une fibrose à 20 semaines. Srebp-1c joue un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie lipidique en modulant le métabolisme du cholestérol et des acides gras. Plus particulièrement, il régule la *lipogenèse de novo* dans le foie, le tissu adipeux et l'adipogenèse. En plus du métabolisme des lipides, des données élargissent le rôle de SREBP-1c dans le stress du réticulum endoplasmique. Cependant ce modèle engendre une diminution de la graisse corporelle (Ren et al., 2017).

- *Inhibition de l'oxydation des lipides*

Les souris déficiente pour PPAR α n'accumulent pas de graisses dans le foie dans des conditions d'alimentation normale mais développent une stéatose sévère lorsqu'elles sont soumises à un jeun de 24h ou nourries avec un HFD, mais n'évolueront pas vers une MASH (Svegliati-Baroni et al., 2006). Cependant, sous régime MCD ces souris développent une stéatohépatite, ce qui signifie que la déficience pour PPAR α aggrave la stéatohépatite causée par une carence en méthionine et choline. PPAR α (Peroxisome Proliferator activated receptor- α) est un facteur de régulation clé qui régule notamment la transcription des gènes impliqués dans les systèmes d'oxydation des acides gras mitochondriaux (Kashireddy and Rao, 2004).

Les souris déficientes pour Acyl-coenzyme A oxydase (AOX) présentent une β -oxydation peroxysomale défectueuse d'acides gras à très longues chaînes qui vont par conséquent s'accumuler dans le foie et conduire au développement d'une stéatohépatite sans fibrose marquée (Ibrahim et al., 2016). Cependant aux alentours de 6 à 8 mois, il est possible de constater une augmentation compensatoire de l'oxydation des acides gras et par conséquent la disparition de la stéatose due à une régénération des hépatocytes (Cook et al., 2001).

- *Entraver le transport des graisses*

Les souris déficientes pour CD36 (translocase d'acides gras) présentent une diminution de l'absorption et de l'utilisation des acides gras par le muscle squelettique, ce qui favorise la lipolyse dans le tissu adipeux et augmente les acides gras libres plasmatiques et par conséquent l'apport d'acides gras dans le foie (Vroegrijk et al., 2013). Ces souris vont développer une stéatose, une inflammation, un taux élevé d'acides gras circulants, de triglycérides ainsi qu'une résistance à l'insuline hépatique.

Les souris déficiences pour l'Apolipoprotéine-E (ApoE : ligand pour les récepteurs des lipoprotéines) ne présentent qu'une stéatose lorsqu'elles sont nourries avec un régime normal (Ma et al., 2008). Cependant lorsqu'elles sont alimentées avec un régime riche en cholestérol et en graisses, elle développent un syndrome métabolique et des caractéristiques de la MASH humaine comme une stéatose, un ballonnement des hépatocytes, une fibrose et une augmentation du taux de cholestérol hépatique libre (Schierwagen et al., 2015). Ainsi ces souris *ApoE^{-/-}* qui reçoivent un régime « occidental » possèdent non seulement les caractéristiques histologiques et métaboliques et la MASH humaine, ce qui en fait un outil précieux dans la recherche sur la MASH.

iii. Modèles chimiques

Les facteurs chimiques couramment utilisés pour favoriser la progression de la MASLD sont (Zhong et al., 2019) :

- L'injection intrapéritonéale ou sous-cutanée chez les animaux nouveau-né de faibles doses de **streptozotocine**, ce qui entraîne le développement d'une inflammation chimique et la destruction des îlots pancréatiques. Cette méthode doit être combinée à des modèles diététiques comme l'HFD pour induire la MASLD.
- L'injection intrapéritonéale de **tétrachlorure de carbone (CCL4)** permet d'établir des lésions hépatiques aiguës. En produisant des radicaux libres d'oxygènes activés, le CCL4 accélère le processus de dégénérescence graisseuse et conduit à la destruction de la structure et de la fonction hépatocellulaire. En effet, au niveau hépatique, le CCL4 est métabolisé par le cytochrome P450 (CYP2E1) pour former des radicaux libres de

trichlorométhyl (CCL3) qui vont favoriser la peroxydation des lipides et le développement des dommages hépatocellulaires. Ce composé induit le développement d'une fibrose mais pas d'obésité, ni de résistance à l'insuline. Ainsi, ce modèle peut également être associé à des modèles diététique (HFD, CDAA, CDAA-HFD) pour établir un vrai modèle de MASLD.

h) Traitements pharmacologiques

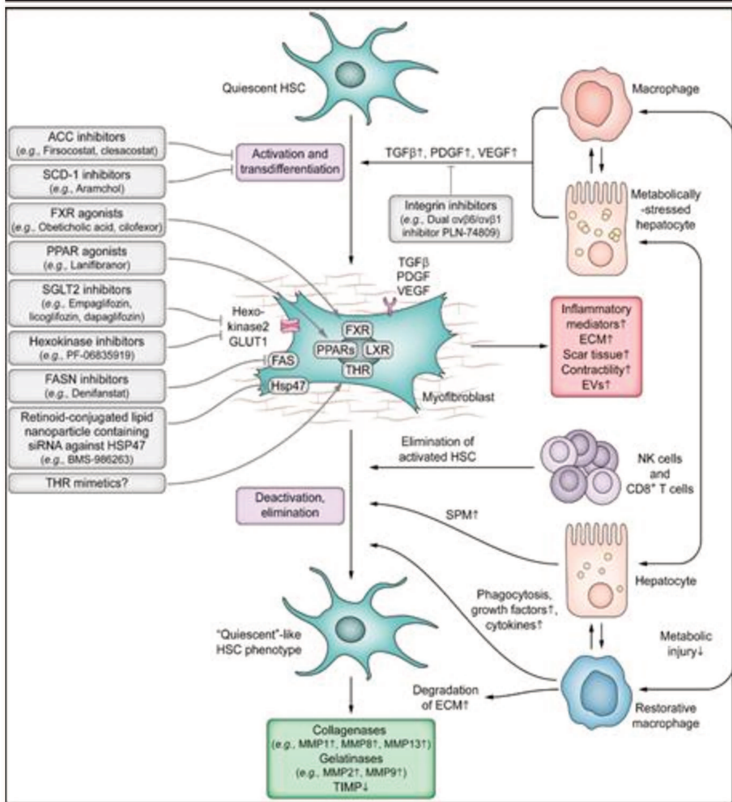
En raison de sa forte prévalence, la MASLD est un problème de santé publique majeur et présente un grand intérêt pour la recherche biomédicale. Jusqu'à très récemment, aucun traitement pharmacologique n'a été approuvé, hormis la recommandation de la mise en place de mesures hygiéno-diététiques et des modifications du style de vie. C'est pourquoi, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la pathophysiologie de la MASLD afin de pouvoir proposer de nouvelles approches thérapeutiques et prévenir le développement de complications sévères. Etant donné que la MASH et la fibrose conduisent au développement d'une cirrhose, les approches utilisées ont soit cherché à atténuer la dérégulation métabolique et les lésions cellulaires, soit à cibler directement l'inflammation et la fibrose (Tacke et al., 2023). De nombreux essais thérapeutiques pré-cliniques et cliniques sont en cours et ces différentes molécules balayent des champs d'action très variés puisque la MASLD est une pathologie multi-systémique avec l'implication de différents organes (intestin, tissu adipeux, foie). Pour des raisons synthétiques, vous trouverez dans la **figure 10** un récapitulatif des traitements et de leurs cibles. Je souhaiterais cependant aborder quelques études pertinentes.

Figure 10. Schéma récapitulatif des différentes molécules en essais pré-cliniques et cliniques pour traiter la MASLD. (Page suivante)

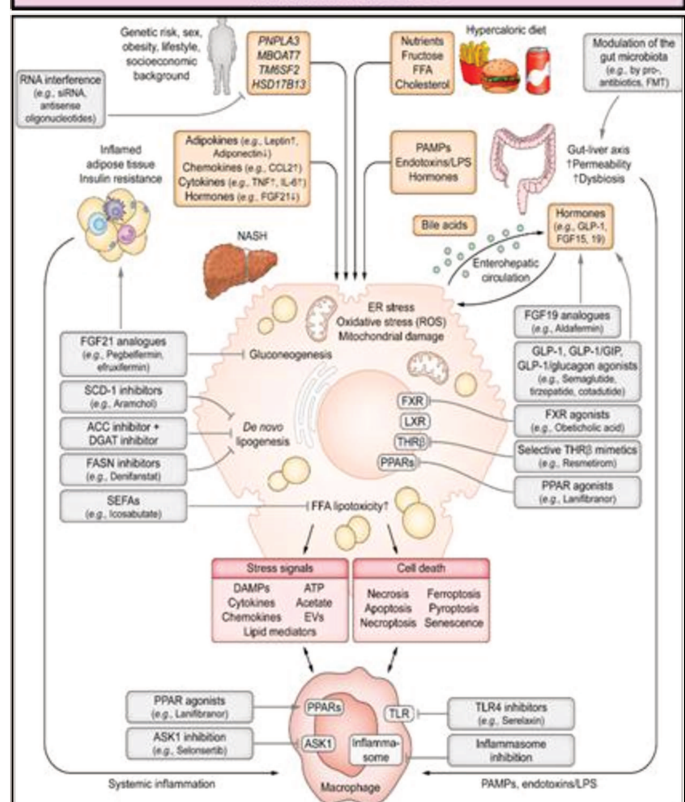
Les essais thérapeutiques s'orientent selon trois axes : **i-** le ciblage de l'activation des cascades inflammatoires. Les stratégies pharmacologiques ciblent la dérégulation métabolique et les lésions des hépatocytes ainsi que les signaux inflammatoires extrahépatiques ; **ii-** le ciblage de l'activation, du recrutement et du dialogue cellulaire des cellules immunitaires. Les stratégies pharmacologiques ciblent l'activation et la polarisation des cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes T), inhibent l'infiltration hépatique des cellules immunitaires inflammatoires (neutrophiles, monocytes, macrophages) ou modulent le dialogue intercellulaire ; **iii-** le ciblage de la fibrogenèse. Les stratégies pharmacologiques ciblent l'interaction des cellules stellaires hépatiques avec les cellules inflammatoires et les médiateurs activateurs des cellules stellaires hépatiques, la dérégulation métabolique et les voies de signalisation dépendantes de l'énergie nécessaires à la transdifférenciation en myofibroblastes. Les composés testés en essais thérapeutiques sont illustrés dans les encadrés gris.

(Adaptée de Tacke et al., 2023)

Cibler la fibrogénèse

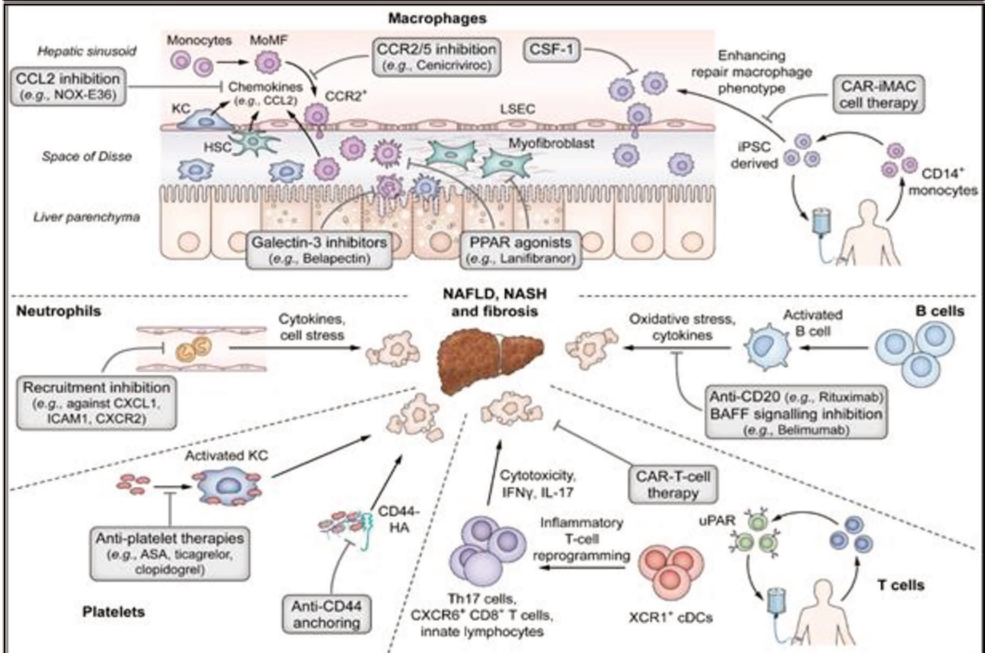


Cibler l'activation des cascades inflammatoires



Thérapies sur 3 axes

Cibler l'activation, le recrutement et le dialogue des cellules immunitaires



Récemment, il a été montré que des souris déficientes pour le récepteur à la sérotonine 5HT_{2A} présentaient une suppression de la stéatose ainsi qu'une réduction de l'expression des gènes liés à la fibrose. Sur ces observations, ils ont alors développé un antagoniste du 5HT_{2A}, nommé « composé 11c ». Ce composé montre une bonne activité *in vitro*, une bonne stabilité, ainsi qu'une bonne pharmacocinétique *in vivo* chez le rat et le chien. Le composé 11c présente également une bonne efficacité *in vivo* dans un modèle de souris mâles souffrant d'obésité, suite à la mise sous régime CDAA, avec une amélioration des caractéristiques histologiques de la MASH et de la fibrose. Actuellement, son mode d'action complet n'est pas clairement connu et s'oriente possiblement sur une régulation de l'activation et de la prolifération des cellules stellaires hépatiques et des macrophages. Les résultats préliminaires qui existent autour de ce composé, lui ont permis d'obtenir le grade de candidat médicament prometteur et fait l'objet d'un essai clinique de phase 1 (Pagire et al., 2024).

Début mars 2024, Madrigal Pharmaceuticals, Inc. a annoncé que la demande de mise sur le marché du resmetirom dans le traitement de la stéatohépatite associée à un dysfonctionnement métabolique (MASH) avec fibrose hépatique a été validée et est maintenant en cours d'évaluation par le Comité des médicaments à usage humain. Le resmetirom est un agoniste THR- β (thyroid hormone receptor- β) à prise quotidienne, administrée par voie orale et dirigée vers le foie pour cibler les principales causes sous-jacentes de la MASH. En effet, la fonction THR- β dans le foie MASH est souvent altérée, ce qui entraîne une réduction de la fonction mitochondriale et une β -oxydation des acides gras en association avec une augmentation de la fibrose. Les données des études cliniques démontrent notamment que le resmetirom est efficace pour réduire la teneur en graisses hépatiques, réduire les enzymes hépatiques, améliorer les marqueurs non invasifs de la fibrogenèse hépatique et diminuer la rigidité hépatique tout en suscitant un profil cardiovasculaire favorable avec une réduction des lipides sériques (cholestérol) (Karim and Bansal, 2023). Enfin, l'essai de phase III MAESTRO-NASH évaluant l'efficacité et l'innocuité du resmetirom chez les adultes atteints de MASH confirmée par biopsies (966 patients), a montré une résolution de la MASH définie par analyse histologique sans aucune aggravation de la fibrose chez 25 à 30% des patients des groupes resmetirom, comparé à 10% des patients du groupe placebo. Par ailleurs, le traitement a été associé à une amélioration de la fibrose d'au moins 1 stade sans aucune complication du NAS score chez 25% des patients du groupe resmetirom (vs 15% pour le groupe placebo) (Harrison Stephen A. et al., 2024). Ainsi, l'acceptation de la mise sur le marché de ce composé est une grande

première et représente une avancée considérable pour le traitement médicamenteux de la stéatohépatite métabolique dont la prévalence est en perpétuelle augmentation.

J'aimerais également aborder très brièvement le cas de certains composés prometteurs : les agonistes PAN-PPAR et les agonistes des récepteurs GLP-1.

Le lanifibranor, un agoniste des Pan-PPAR qui module les principales voies métaboliques, inflammatoires et fibrogéniques dans la pathogénèse de la MASH. Le Lanifibranor est considéré comme traitement pharmacologique candidat dominant pour la MASLD (Yoneda et al., 2022).

Les agonistes des récepteurs GLP-1 se sont également révélés être des candidats extrêmement prometteurs notamment pour les patients présentant des comorbidités concomitantes telles que l'obésité et le diabète. La liraglutide présente des taux plus élevés de résolution de la MASH et des taux plus faibles de progression de la fibrose. Une diminution du poids corporel total de 5,5% par rapport au placebo a également été observée (Essai en phase II). Le sémaglutide a également apporté des résultats prometteurs et des essais de phase 3 sont en cours pour savoir s'il répondra à l'un des critères d'évaluation clinique (Nevola et al., 2023).

Certains composés, pourtant prometteurs, n'ont pas cette chance. C'est notamment le cas de l'acide obéticholique, agoniste du récepteur Farnésolide X (FXR) et des agonistes des PPAR. L'acide obéticholique améliore le métabolisme des lipides hépatiques et du glucose et atténue l'inflammation et la fibrose hépatique au cours de la MASLD. Par ailleurs les agonistes FXR diminuent l'inflammation hépatique (Yao et al., 2014; Younossi et al., 2019). Malgré les résultats encourageants des essais cliniques en phase III, certaines questions demeurent : bénéfice à long terme, conséquences métaboliques, etc... Des études sont toujours en cours afin de répondre à ces questions (Sanyal et al., 2023).

III- CD44 : un acteur de la régulation métabolique et des fonctions immunitaires

a) Structure

CD44 est une glycoprotéine transmembranaire également appelée P-glycoprotéine 1 codée par un seul gène sur le locus chromosomique 11p13 chez l'Homme et sur le chromosome 2 chez la souris. CD44 est exprimé de manière constitutive à la surface de nombreuses cellules de mammifères, incluant les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les fibroblastes, les kératinocytes et les leucocytes. Le gène codant pour CD44 est composé de 19 exons chez l'Homme (dépourvu de l'exon 6) et de 20 exons chez la souris. La forme standard de CD44 (Cd44s) est codée par les 10 exons constants (les 5 premiers et les 5 derniers) et forme l'isoforme la plus courte (Ponta et al., 2003). La transcription de CD44 est sujette à un épissage alternatif qui va notamment affecter le domaine variable de la protéine. Les neuf exons du centre peuvent être alternativement épissés et assemblés avec les dix exons constants et ainsi former les variants de CD44 (CD44v). Les isoformes variantes de CD44 peuvent être insérées en tant qu'exon variant unique ou combinées avec d'autres exons variants. Les 5 premiers exons de CD44 codent pour le domaine protéique amino-terminal qui contient des motifs fonctionnant comme des sites d'ancrage pour plusieurs composants de la matrice extracellulaire (ECM) tels que l'acide hyaluronique (HA), l'ostéopontine (OPN), le collagène, les protéoglycanes sulfatés, la chondroïtine et la fibronectine (Jordan and Racine, 2015; Weber et al., 1996). Le domaine variable forme une structure en tige de taille variable et qui sépare le domaine amino-terminal de la membrane plasmique. Enfin, la région transmembranaire serait responsable de l'association des protéines CD44 avec les radeaux lipidiques (**Figure 11**).

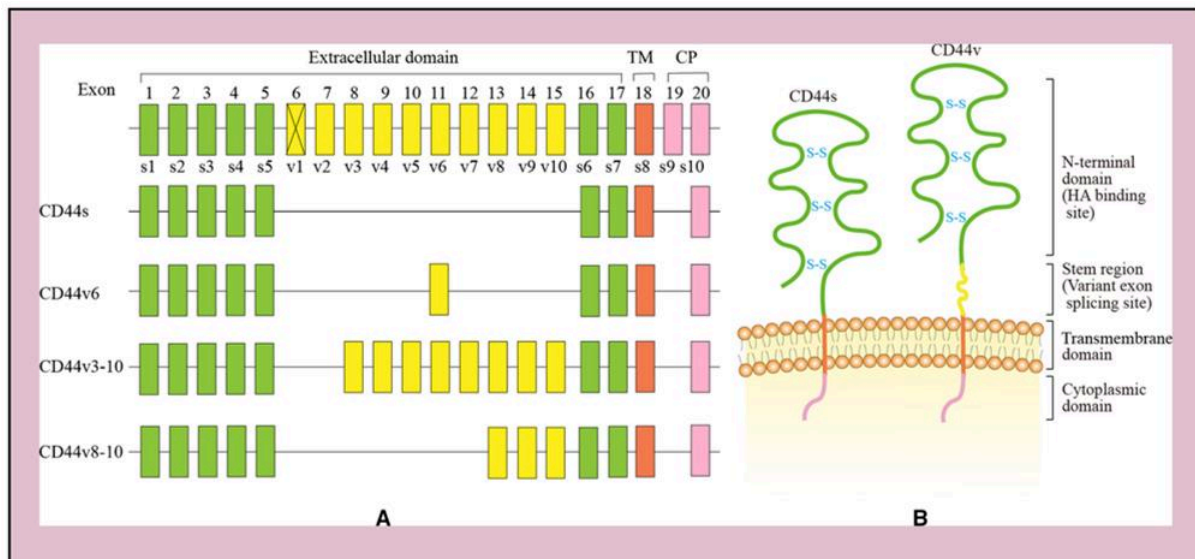


Figure 11. Représentation schématique de la protéine CD44s et CD44v ainsi que de la structure de son gène.

(A) Le gène CD44 est constitué de 20 exons pour la souris et de 19 exons pour l'Homme. CD44s est codé pour les exons 1 à 5, 16 à 18 et 20, et il est contenu dans toutes les molécules de CD44. L'exon 19 subit un épissage alternatif, ce qui donne une queue courte qui est épissée dans la plupart des isoformes de CD44. L'épissage alternatif des exons 6 à 15 pour la souris et 7 à 15 pour l'Homme génère plusieurs variants de CD44 (CD44v). CD44v peut contenir plusieurs exons variants tels que CD44v6, CD44v3-10 ou CD44v8-10. (B) Domaines structuraux de CD44. Quatre domaines de la protéine CD44 sont représentés : le domaine de liaison à l'acide hyaluronique/domaine N-terminal ; la région variable ; le domaine transmembranaire ; et le domaine cytoplasmique C-terminal court. (Extrait de Guo et al., 2022)

b) Fonctions

i. Généralité et modes d'action

CD44 assure différentes fonctions physiologiques essentielles dans les interactions cellule-matrice ou encore cellule-cellule en jouant notamment un rôle dans l'adhésion, la prolifération, la migration, l'hématopoïèse, l'extravasation et l'activation des lymphocytes (« homing », migration, « rolling »). C'est à la surface des lymphocytes T que CD44 a été décrit pour la première fois ce qui explique qu'une grande majorité des études sur CD44 se soient d'abord focalisées sur son implication dans l'activation des lymphocytes T, avant de s'élargir à d'autres populations de cellules immunitaires (macrophages) (DeGrendele et al., 1997; Dong et al., 2018; Kawana et al., 2008; Liang et al., 2007). Au cours du temps, les connaissances sur les fonctions de CD44 se sont approfondies et leur implication dans des cascades de signalisation

cellulaire s'est notamment révélée. CD44 possède trois modes d'action (Ponta et al., 2003): i- agir comme un récepteur en reconnaissant différents ligands issus ou non de la matrice extracellulaire (ostéopontine, acide hyaluronique, sélectine-E) (Jordan and Racine, 2015; Katayama et al., 2005; Nagoshi, 2014); ii- agir comme un co-récepteur en s'associant à d'autres récepteurs (TLR4, VEGFR, CXCR4, EGFR...) afin de moduler leur activité (angiogenèse, fibrogenèse, inflammation) (Ponta et al., 2003) ; iii- agir au niveau moléculaire en établissant un lien entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine afin de favoriser la signalisation cellulaire via l'interaction avec des protéines d'adaptation (ezrine, radixine, moésine (ERM)) (Ponta et al., 2003).

ii. CD44 et lymphocytes T

Les mécanismes d'adhésion dépendants de CD44 sont importants pour la mobilisation des lymphocytes T effecteurs vers les sites d'infection et d'inflammation (Camp et al., 1993). Au niveau des sites d'infection, les cellules endothéliales activées en réponse aux cytokines inflammatoires, sécrètent des chimiokines et expriment à leur surface des sélectines endothéliales (sélectines E et P), de l'acide hyaluronique (HA) et des ligands d'intégrine (VCAM-1) (Baaten et al., 2012). CD44 peut alors médier des interactions de « rolling » avec ces cellules endothéliales par l'intermédiaire de l'HA, ligand naturel, ou encore la E-selectine. Par ailleurs, les chimiokines ayant été sécrétées par les cellules endothéliales vont activer la signalisation GPCR au sein des lymphocytes T et ainsi renforcer les affinités des intégrines (VLA-4-VCAM) et par conséquent l'adhésion des cellules T. De plus, CD44 peut s'associer avec l'intégrine VLA-4 afin de renforcer la signalisation et favoriser avec succès la migration de ces cellules vers les sites d'inflammation (Alon et al., 1995; Marhaba et al., 2006; Siegelman et al., 2000). Par la suite, la signalisation via CD44 entraîne des changements cytosquelettiques nécessaires à l'extravasation des lymphocytes T (Camp et al., 1993). En effet, l'engagement de CD44 va : i- entraîner l'activation de la tyrosine kinase non réceptrice (Pyk2) d'une manière dépendante de PI3K favorisant alors la propagation cellulaire (Wong et al., 2011) ; ii- activer la kinase Lck nécessaire à la polymérisation de l'actine (Nandi et al., 2004) ; iii- s'associer directement aux protéines ERM qui favorisent le réarrangement du cytosquelette d'actine (Miyake et al., 2013). Le développement de la polarité cellulaire ainsi que la diapédèse se font par les molécules JAM et PECAM qui vont alors permettre la transmigration des lymphocytes T dans les tissus (Ley et al., 2007). Après la diapédèse, les lymphocytes T ont une forme

amiboïde et migrent de manière polarisée le long des fibrilles de collagène vers le site de l'infection/inflammation en réponse à un gradient de chimiokines (**Figure 12**). Une étude utilisant l'imagerie intravitale des lymphocytes T CD8⁺ a révélé une altération de la motilité des cellules CD44^{-/-} dans les explants tumoraux (Mrass et al., 2008). CD44 présente donc un rôle essentiel dans le maintien de la forme et du mouvement polarisés qui sont importants pour la mise en place d'une réponse effectrice efficace. En plus de jouer un rôle important dans le recrutement des lymphocytes T, CD44 va également affecter la fonction mémoire de ces cellules en augmentant leur activation, en favorisant la survie et en régulant l'homéostasie. En effet, suite à la reconnaissance de l'antigène par l'intermédiaire du TCR, l'affinité et l'expression de CD44 sont régulées à la hausse. CD44 va recevoir les signaux d'HA présenté à la surface des CPA (Hegde et al., 2008). De plus, CD44 va également contribuer à la transduction du signal en augmentant la disponibilité de la kinase Lck pour l'engagement de ZAP-70, qui se lie au TCR afin de transmettre les signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T (Lefebvre et al., 2010; Taher et al., 1996). Par la suite, il a également été mis en évidence que la liaison de l'HA à CD44 pouvait induire un signal de survie et favoriser la survie des Th1 et inhiber l'apoptose, soit par « obstruction » directe de Fas (Hauptschein et al., 2005) ou en affectant sa signalisation (Jones et al., 2002). De manière intéressante, il a été montré dans des lymphocytes Treg que l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire (HMW-HA) régulait à la hausse le facteur de transcription FoxP3 par l'intermédiaire de la signalisation CD44. Cette augmentation de FoxP3 est associée à une importante production d'IL-10 et une augmentation de l'expression du TGFβ1 de surface qui sont tous deux essentiels pour la fonction régulatrice des Treg (Bollyky et al., 2007). Enfin, au cours de l'homéostasie, la liaison de l'HA par CD44 semble augmenter la réactivité du récepteur à l'IL-17 (IL-17Ra), ce qui conduit à une régulation positive de Bcl2 par l'intermédiaire de la signalisation Stat5 (Boyman et al., 2009; Kassiotis et al., 2002). CD44 est donc également impliqué dans la régulation de la transition des cellules effectrices vers les cellules mémoires, ainsi que dans le maintien des lymphocytes T mémoires.

En 2009, une étude a montré que la déficience de CD44 favorisait le développement des cellules effectrices Th2 murines en réponse à des antigènes particuliers et solubles (globules rouges de mouton et à l'ovalbumine de poulet) alors que la réponse Th1 étaient inhibée. Les résultats ainsi présentés dans cette étude semblent démontrer l'implication de CD44 dans la participation à la régulation de la différenciation Th1-Th2 (Guan et al., 2009). Plus récemment, une étude menée chez l'Homme a mis en évidence que le variant CD44v5 était fortement exprimé chez les

cellules Th2 humaines. Le traitement de cette isoforme par l'intermédiaire d'anticorps anti-CD44v5 a révélé une inhibition de la différenciation Th2 causée par la dégradation de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-4 (IL-4R α) (Yang et al., 2022). Ces 2 études aux résultats opposés, mettent clairement en évidence que la diversité fonctionnelle de CD44 repose notamment sur les différentes isoformes de CD44 pouvant être générées après épissage alternatif.

D'autres fonctions de CD44 ont également été mises en évidence telles que son implication dans la phagocytose, la clairance des cellules apoptotiques et des agents pathogènes microbiens (Teder et al., 2002; Vachon et al., 2006).

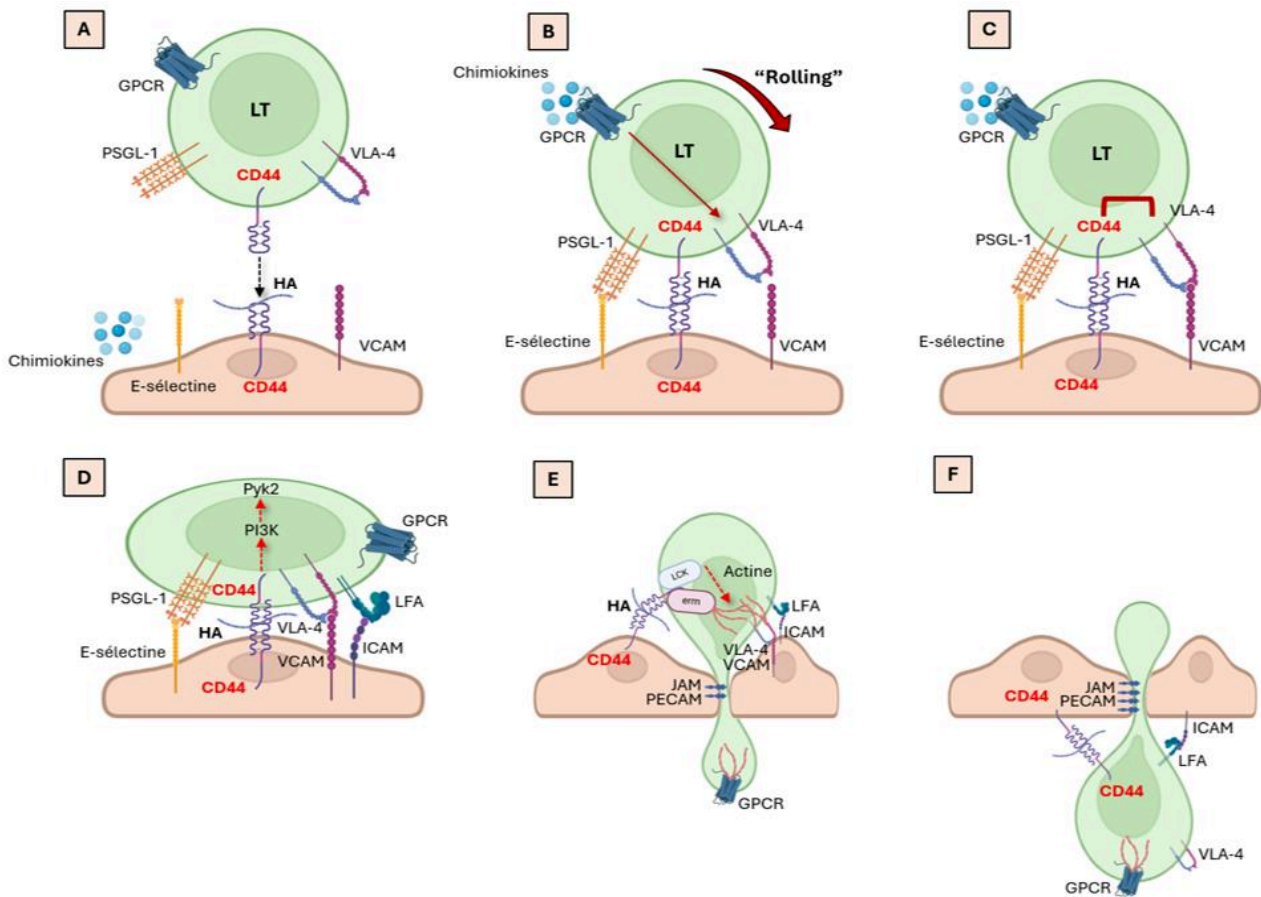


Figure 12. Rôle de CD44 dans les mécanismes cellulaires et moléculaires de « rolling », d'adhésion, de « crawling » et de transmigration des lymphocytes T.

(A-C) Les mécanismes d'adhésion dépendants de CD44 sont importants pour la mobilisation des lymphocytes T effecteurs dans les sites d'infection et d'inflammation. Sur ces sites, les cellules endothéliales sécrètent des chimiokines et expriment des sélectines (E et P), de l'acide hyaluronique (HA) et des ligands d'intégrine (VCAM-1) en réponse aux cytokines inflammatoires (A). CD44 peut médier des interactions de « rolling » (phase de roulement du lymphocyte) favorisant le avec les cellules endothéliales vasculaires qui expriment l'HA ou même la sélectine E (B). La signalisation des chimiokines entraîne l'augmentation de l'affinité de l'intégrine, comme VLA-4, ce qui améliore l'adhérence. L'engagement de CD44 avec l'HA peut également déclencher une régulation positive et favorise la liaison VLA-4/VCAM (C).

(D-F) CD44 joue un rôle essentiel lors de l'adhésion ferme et du « crawling intravasculaire » (mouvement rampant) pour médier la transmigration des lymphocytes T. L'engagement de CD44 active la tyrosine kinase non réceptrice Pyk2, d'une manière dépendante de PI3K et intervient dans la propagation cellulaire lors de l'adhésion ferme (AD). En plus de Pyk2, l'engagement de CD44 active la kinase Lck qui est nécessaire à la polymérisation de l'actine (E). De plus, le cytosquelette est médié par les protéines ERM qui sont également induites à la suite de la signalisation PI3K. CD44 peut s'associer directement aux protéines ERM, qui réticulent CD44 et d'autres protéines du cytosquelette d'actine. Le développement de la polarité cellulaire et la diapédèse se font par PECAM et JAM qui permettent l'extrusion des filopodes dans les jonctions des cellules endothéliales et la transmigration dans les tissus (F).

(Adaptée de Baaten et al., 2012)

iii. CD44 et macrophages

Le rôle de CD44 est particulièrement bien décrit dans de nombreux cancers, notamment pour le rôle qu'il exerce sur l'infiltration de cellules immunitaires au sein de la tumeur, et en particulier les macrophages. Récemment, une étude a décrit que l'expression de CD44 au sein de tumeurs de la vessie était positivement corrélée à l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales, ainsi qu'au nombre de macrophages CD68 et de macrophages CD163 (macrophages ayant une activité angiogénique). Ainsi, cette étude suggère que CD44 est un régulateur positif de PD-L1 ainsi qu'un régulateur important de l'infiltration des macrophages tumoraux, conduisant à un mauvais pronostic pour les patients (Liu et al., 2023).

Il a été montré que les macrophages associés aux tumeurs (TAM) coopéraient avec les cellules souches cancéreuses dans le microenvironnement tumoral afin de maintenir cet état cancéreux. De plus, l'activation et la signalisation PI3K-4EBP1-SOX2 régulent les propriétés des cellules souches cancéreuses (CSC), mais le contrôle moléculaire en amont de cette voie ainsi que les mécanismes par lesquels passent le dialogue des TAM et des CSC ne sont pas encore clairement élucidés. Étant donné que CD44 est également exprimé par les cellules souches cancéreuses, l'hypothèse que CD44 (CD44v8-v10) pourrait jouer le rôle de médiateur moléculaire entre les TAM et les CSC, par l'intermédiaire de l'acide hyaluronique (HA), n'est visiblement pas à exclure (Gomez et al., 2020).

En dehors du lien qui existe entre CD44 et les macrophages dans des contextes cancéreux, il a été montré que CD44 favorisait le recrutement de macrophages au niveau pulmonaire après une infection des souris à *Streptococcus zooepidemicus*. Par ailleurs, l'expression de CD44 par les macrophages est impliquée dans la médiation de la phagocytose de *S. zooepidemicus* par les macrophages. Par ailleurs le déficit de CD44 altère la liaison de *S. zooepidemicus* aux macrophages et augmente par conséquent la croissance et la dissémination bactérienne. Ainsi, CD44 améliore la phagocytose des macrophages et joue un rôle protecteur dans l'infection à *S. zooepidemicus* (Fu et al., 2017). Par ailleurs, il a également été mis en évidence que la migration des macrophages au niveau hépatique chez des souris MASH, était médiée par CD44 et l'activation de la voie pFAK-NF- κ B, suite à la libération d'ostéopontine par les hépatocytes stressés (Jiang et al., 2021).

De plus, l'étude de Patouraux *et al.* menée au sein de notre laboratoire a mis en évidence l'implication de CD44 dans le recrutement des macrophages au cours de la MASH. En effet,

l'invalidation générale de CD44 a fortement diminué l'activation des macrophages par le LPS, les DAMPs et les acides gras saturés. De plus, la neutralisation de CD44, suite à l'utilisation d'un anticorps α CD44 chez les souris atteintes de stéatohépatite a fortement diminué l'infiltration des macrophages et l'expression du ligand des chimiokines CCL2 avec une correction partielle de l'inflammation et des lésions hépatiques (Patouraux et al., 2017).

Par ailleurs, il a également été montré qu'en réponse à une lésion stérile dans le foie les macrophages (F4/80^{hi}GATA⁺) venant d'un réservoir de la cavité péritonéale étaient capables d'envahir les tissus atteints d'une manière dépendante de CD44 (Wang and Kubes, 2016).

c) Son rôle dans les cancers et les maladies métaboliques

i. Cancer

La liaison de l'acide hyaluronique (HA) au récepteur CD44 représente une interaction moléculaire qui contrôle divers processus physiologiques et pathologiques. La dérégulation de cet axe est impliquée dans plusieurs maladies y compris le cancer, où elle favorise la progression tumorale, les métastases et la résistance au traitement (Bourguignon et al., 2014; Caon et al., 2020; Machado et al., 2022). En effet, de nombreuses études ont mis en évidence la corrélation entre CD44 et les tumeurs malignes humaines et son rôle dans l'aggravation du cancer (Morath et al., 2016; Sneath and Mangham, 1998). Au cours des dernières décennies, CD44 est apparu comme un marqueur important des cellules souches cancéreuses (CSC) permettant leur maintien et leur régulation. Les CSC sont une petite sous-population de cellules à l'intérieur des tumeurs qui possèdent des propriétés semblables à celles de cellules souches comme la capacité d'auto-renouvellement, un potentiel de différenciation et une résistance aux thérapies anti-cancéreuses conventionnelles (Yu and Cirillo, 2020). Les CSC expriment des facteurs de transcription impliqués notamment dans leur auto-renouvellement : Sox2, Oct4 et Nanog (Bourguignon et al., 2012). La liaison de l'acide hyaluronique au récepteur CD44 présent sur les cellules tumorales, peut favoriser l'interaction CD44-Nanog et entraîner par conséquent l'activation de la signalisation Nanog impliquée dans la prolifération, la survie et l'anti-apoptose des cellules tumorales (Bourguignon et al., 2008). Une autre caractéristique des CSC est la résistance à la chimiothérapie. Il est intéressant de noter que plusieurs études ont suggéré que la liaison CD44-HA contribuait également à la formation du complexe Nanog-Stat3 menant à l'expression du gène MDR1 impliqué dans la chimiorésistance cellulaire (Bourguignon et al., 2008). Dans les cellules tumorales du sein, l'activation de CD44 régule à

la hausse l'expression du gène P-gp (glycoprotéine P) et de la protéine anti-apoptotique Bcl, facilitant ainsi la prolifération et la survie des cellules tumorales (Bourguignon et al., 2009). L'ensemble de ces résultats, mettent en avant un rôle crucial de CD44 dans la résistance accrue à la chimiothérapie via une régulation à la hausse de la survie et de la prolifération des cellules souches cancéreuses. Par ailleurs, de plus en plus de preuves suggèrent maintenant que la surexpression de CD44 et de ses isoformes est un indicateur de pronostic défavorable chez les patients atteints de cancer (Cirillo, 2023) (**Table 3**). Il a notamment été mis en avant que les isoformes CD44v3, CD44v6 et CD44v9, plutôt que la forme standard du récepteur (CD44s), présentaient un potentiel pro-tumorigène (Roy et al., 2024) (Go et al., 2016) (Wang et al., 2016) (Eisterer et al., 2001). Le rôle de CD44 dans le développement et la malignité du cancer du foie est à ce jour bien connu. Il a notamment été montré que les hépatocytes exposés à des composés cancérigènes (traitement DEN) exprimaient des niveaux augmentés de CD44 d'une manière dépendante de STAT3. Une fois exprimé à la surface des hépatocytes CD44 (CD44v6) va potentialiser l'activation d'AKT qui va induire la phosphorylation et la translocation nucléaire de Mdm2 ce qui met fin à la réponse p53. En empêchant ainsi leur sortie prématurée du cycle cellulaire et par conséquent leur mort, les hépatocytes péricentraux porteurs de mutations oncogéniques vont proliférer et par conséquent dupliquer et transmettre leurs mutations aux cellules filles qui deviennent des progéniteurs de CHC (Dhar et al., 2018). Par ailleurs, CD44 est fortement exprimé dans les cellules du carcinome hépatocellulaire et dans les échantillons de patients atteints de CHC qui présentaient un potentiel de malignité élevé. Des expériences menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que la régulation négative de CD44 réduisait la formation, la migration et l'invasion des colonies de cellules du CHC, ainsi que la croissance tumorale et le développement de métastases. De plus, l'effet pro-métastase de CD44 pourrait être médié par l'axe de signalisation AKT/ERK du récepteur CXCR4. En effet, l'augmentation de l'expression de CXCR4 par CD44 (CD44v6) favoriserait alors la tendance des tumeurs à envahir et à métastaser les organes distants (Xie et al., 2022). De plus, la surexpression de CD44 dans le CHC pourrait également favoriser la prolifération et la migration des cellules cancéreuses via une régulation positive de YAP, principal régulateur de la voie Hippo (Zhang et al., 2021).

Type de cancer	Principales conclusions	Références
Cancer Colorectal	CD44, CD44v6 et CD44v2 sont corrélés à une survie globale défavorable ; CD44 prédit une mauvaise différenciation, des métastases ganglionnaires et des métastases à distance	(Z. Wang et al., 2019)
Cancer gastrique	L'expression de CD44 dans les cellules souches cancéreuses est principalement associée à de moins bons résultats chez les patients atteints d'un cancer gastrique	(Razmi et al., 2021)
Cancer rectal	Des taux élevés de CD133, CD44, ALDH1, Lgr5 et G9a sont associés à une résistance à la radiothérapie et à un mauvais pronostic	(Mare et al., 2021)
Cancer du sein	Les phénotypes CD44 et CD44+CD24 ⁺ sont associés à un pronostic inférieur chez les patientes	(Abdoli Shadbad et al., 2021)
Cancer du col de l'utérus	L'augmentation de l'expression de CD44 est associée à une faible survie globale dans les tissus cancéreux du col de l'utérus	(Fahmi et al., 2021)
Ostéosarcome	La surexpression de l'isoforme CD44v6 est associée aux métastases dans les ostéosarcomes	(Zhang et al., 2015)
Cancer du poumon	La surexpression de CD44v6 est significativement associée à la différenciation tumorale, au type histologique de tumeur et aux métastases ganglionnaires	(Luo et al., 2014)
Cancer de la tête et du cou	L'expression de CD44 est liée à une aggravation du grade de la tumeur et du pronostic dans le cancer du pharynx, du larynx mais pas dans le cancer de la bouche	(Chen et al., 2014)
Cancer de l'oesophage	La surexpression de CD44 est négativement corrélée à la survie globale et est associée à des métastases ganglionnaires, à un envahissement vasculaire et à une récurrence	(Kamil Mohammed Al-Mosawi et al., 2020)
Cancer du pharyngolarynx	Une expression élevée de CD44v6 est associée à la taille de la tumeur, aux métastases ganglionnaires et à un mauvais pronostic	(Chai et al., 2014)
Carcinome des cellules rénales	Une expression élevée de CD44 est corrélée à un grade de Fuhrman élevé, à une récurrence et à un mauvais pronostic	(Xintao Li et al., 2015)
Cancer du Pancréas	La surexpression de CD44 est associée à un faible taux de survie globale, à une grande invasion des ganglions lymphatiques	(Liu et al., 2018)

Tableau 3. Expression de CD44 dans les différents types de cancers.

(Adapté de Cirillo, 2023)

ii. Maladies Métaboliques

Au cours du temps, le récepteur CD44 a également fini par être identifié comme un acteur clé dans les maladies métaboliques. En 2012, l'étude d'association pangénomique basée sur l'expression génique (eGWAS), visant à trouver des gènes impliqués dans la pathogenèse moléculaire du diabète de type 2, a identifié CD44 comme le meilleur candidat dans le tissu adipeux. Dans la même étude, il a été constaté sur des souris diabétiques présentant une déficience en CD44, une amélioration de la résistance à l'insuline et de l'inflammation au niveau du tissu adipeux. Par ailleurs, le traitement de souris sous régime riche en graisses avec un anticorps anti-CD44 améliore la glycémie et l'accumulation de macrophages dans le tissu adipeux. En parallèle, des études menées chez l'Homme ont mis en avant l'expression de CD44 dans les cellules inflammatoires du tissu adipeux de patients atteints d'obésité et les taux

sériques de CD44 sont positivement corrélés à la résistance à l'insuline et au contrôle glycémique (Kodama et al., 2015, 2012). Dans ce même sens, une perte de poids observée chez des patients atteints d'obésité est associée à une forte diminution de l'expression génique de CD44 et du marqueur de macrophages CD68 dans le tissu adipeux (L. F. Liu et al., 2015). Ces premières informations ont donc clairement mis en lumière le rôle causal de CD44 dans le développement de l'inflammation du tissu adipeux et de la résistance à l'insuline chez le rongeur mais aussi chez l'Homme. En plus de trouver l'expression de CD44 augmentée dans le tissu adipeux pendant l'obésité, celle-ci est également plus élevée au niveau hépatique. De plus, une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse et le transport des acides gras (*Fasn*, *CD36*), la synthèse *de novo* des triglycérides (*Mogat1*) et l'accumulation des triglycérides (*Cidea*, *Cidec*) est observée chez des souris invalidées pour CD44 et nourries avec un régime riche en graisses (HFD). Ces observations ont donc démontré que les souris déficientes pour CD44 présentaient une susceptibilité à réduire le développement de la stéatose hépatique. De la même manière, une diminution de l'expression génique hépatique des marqueurs de l'inflammation et de la fibrogenèse chez les souris CD44KO-HFD a été mise en avant (Kang et al., 2013). La régulation des désordres métaboliques par CD44 passe également par la régulation de l'expression de ses ligands et notamment l'ostéopontine (OPN) décrite pour être impliquée dans le développement de la stéatose, la fibrose et l'insulino résistance (Nagoshi, 2014). En effet, l'expression hépatique et adipeuse de l'OPN est augmentée au cours de la MASLD à la fois chez les souris et les patients atteints d'obésité (Bertola et al., 2009; Patouraux et al., 2012; Soysouvanh et al., 2023). Par ailleurs, l'inactivation de CD44 dans les macrophages péritonéaux abolit leur migration en réponse à l'OPN et à CCL2 (Zhu et al., 2004). Il est important de préciser que les autres ligands de CD44 comme l'acide hyaluronique (HA) et la sélectine-E sont aussi régulés au cours des maladies chroniques du foie comme les MASLD (Bertola et al., 2010; Katayama et al., 2005; Rostami and Parsian, 2013; Ruppert et al., 2014).

Dans la continuité de ces études, l'équipe a montré que CD44 était bien un marqueur clé de l'inflammation hépatique au cours de la MASH, notamment pour son rôle dans l'infiltration des neutrophiles et des macrophages au niveau hépatique, mais également pour son implication dans la polarisation des macrophages inflammatoires. Par ailleurs, comme indiqué précédemment dans ce manuscrit, le ciblage *in vivo* de CD44 par l'utilisation d'un anticorps neutralisant, mais également chez des souris CD44-KO, prévient et corrige les complications hépatiques provoquées par un régime MCDD, notamment en diminuant l'inflammation hépatique et la fibrose (Patouraux et al., 2017).

De manière intéressante, de nombreux changements architecturaux ont été montrés dans le foie d'un modèle murin de fibrose hépatique induit par injection de CCL4 (Peiseler et al., 2023). En effet, ce remodelage comprenait notamment une augmentation massive de vaisseaux collatéraux et de dépôts de collagène autour des sinusoides entraînant une perte de contact des cellules de Kupffer avec leur environnement hépatique et par conséquent une perte de leur identité (régulation négative des marqueurs CLEC4F, TIM4...). Afin de compenser ce processus, une abondance de monocytes recrutés depuis la moelle osseuse (formation d'un syncytia) ont adhéré au gros vaisseau hépatique par l'intermédiaire de CD44 et ont commencé à exprimer les marqueurs des cellules de Kupffer afin de compenser leur perte d'identité.

De plus, chez les patients atteints d'obésité, l'expression hépatique de CD44 et le nombre de cellules CD44⁺ corrélaient avec la sévérité de la MASH. Plus récemment, une étude s'est intéressée au rôle de CD44 dans les préadipocytes sur la régulation des fonctions des adipocytes dans le tissu adipeux. L'inactivation de CD44 dans les préadipocytes, réalisée par le système Crispr Cas9, favorise l'adipogenèse, tandis que sa réexpression par l'utilisation d'un lentivirus, abolit cet effet, diminue la réponse à l'insuline et la sécrétion d'adiponectine dans les cellules 3T3-L1. D'après des données protéomiques, CD44 aurait donc un rôle crucial dans la régulation de l'adipogenèse en régulant notamment PPAR γ ainsi que les voies liées au cycle cellulaire. Cette étude publiée en 2023, met en avant pour la première fois la preuve que CD44 exprimé par les préadipocytes joue un rôle clé dans la régulation de la fonction adipocytaire en dehors des cellules immunitaires où CD44 est principalement exprimé (Weng et al., 2023). Il est donc clair, qu'afin de mieux comprendre le rôle exact de CD44 au cours de la MASLD, il devient de plus en plus pertinent de générer des modèles d'inactivation de CD44 de manière « cellule-spécifique ». De manière intéressante, l'expression de CD44 par certaines sous-populations de cellules innées lymphoïdes (ILC) intestinales a été mise en évidence chez l'Homme et la souris (Chea et al., 2015; Zhong and Zhu, 2017). Il paraît donc très pertinent et intéressant d'évaluer la contribution de CD44 au sein de ces ILC hépatiques et intestinales.

IV- Cellules innées lymphoïdes : fonctions et métabolisme

a) Description générale

Les cellules innées lymphoïdes (ILC) sont décrites comme une famille élargie de cellules effectrices (s'apparentant à des « lymphocytes innés ») particulièrement enrichies dans les surfaces muqueuses. De manière générale, les ILC jouent un rôle clé dans la défense immunitaire contre les microbes, la régulation de l'immunité adaptative, le remodelage et la réparation tissulaire (Vivier et al., 2018). Contrairement aux lymphocytes conventionnels, les ILC ne possèdent pas de récepteurs cellulaires spécifiques à l'antigène (TCR ou BCR), mais possèdent tout de même de grandes similitudes de par leur capacité à produire des cytokines associées aux réponses Th1, Th2 et Th17 (Spits et al., 2013). Les ILC sont divisées en 5 sous-populations basées sur l'expression de facteurs de transcription spécifiques, de marqueurs de surface cellulaire, et leur capacité à sécréter des cytokines clés. On retrouve dans un premier temps, les cellules tueuses naturelles (NK) conventionnelles, suivies des cellules auxiliaires ILC1, ILC2, ILC3 et enfin les cellules inductrices tissulaires lymphocytaires (LTi) (**Figure 13**).

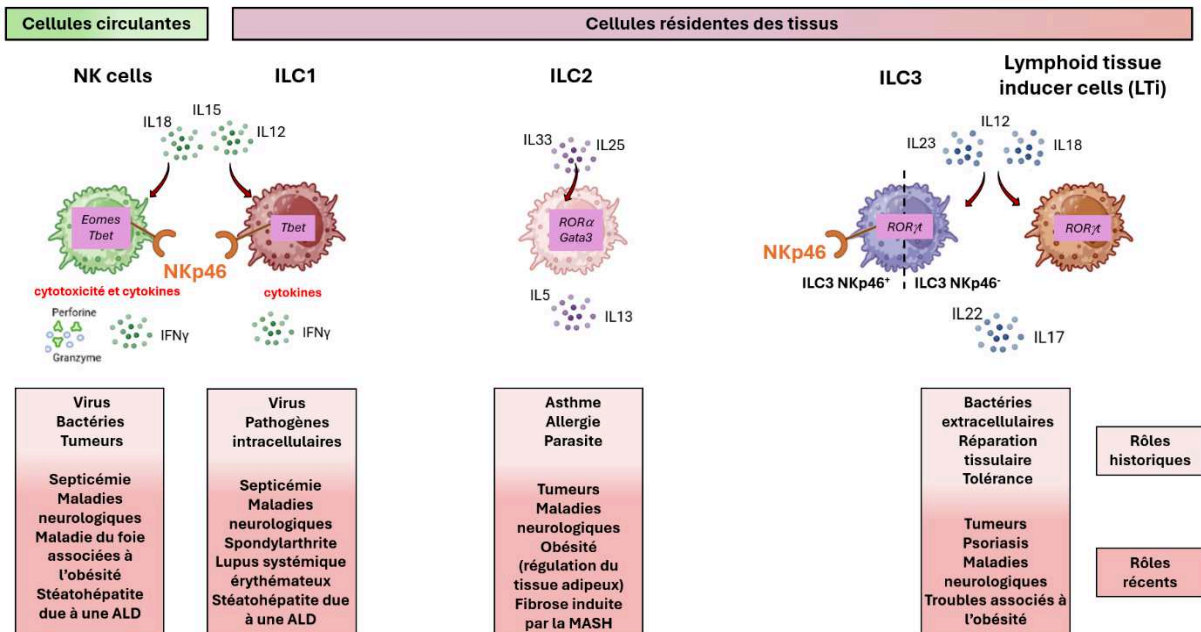


Figure 13. Principales contributions des sous-populations d'ILC à l'immunité.

Les rôles historiquement décrits et les principales contributions récemment découvertes des ILC aux réponses immunitaires sont reportées sur cette figure. (Adaptée de Bourinet et al., 2024)

Les ILC sont considérées comme des cellules résidentes dans de nombreux tissus périphériques, à l'exception des cellules NK qui sont également présentes dans la lymphe et le sang (Meininger et al., 2020). Les ILC se développent à partir du progéniteur lymphoïde commun (CLP) qui réside dans la moelle osseuse. Les CLP se développent ensuite en progéniteurs exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ (α -LP), qui évolue lui-même en progéniteur lymphoïde inné précoce (EILP). Les EILP sont alors capables de produire des cellules NK sous l'influence des facteurs de transcription Eomes et T-bet, mais également toutes les ILC auxiliaires (Yang et al., 2015; Yu et al., 2014.). Pour cela, les EILP vont se développer pour devenir les progéniteurs communs des ILC auxiliaires (CHILP). Les CHILP sont capables de se différencier en toutes les sous-populations d'ILC auxiliaires y compris les cellules LT_i, mais pas en cellules NK (Klose et al., 2014). La population CHILP contient également une sous-population de cellules exprimant la protéine à doigt de zinc de la leucémie promyélocytaire (PLZF), appelées progéniteurs des ILC (ILCP) qui ont perdu leur potentiel de se développer en LT_i, mais conserve la capacité de générer des ILC auxiliaires. Ainsi, les ILC1 se développent sous la dépendance de T-bet, les ILC2 sous la dépendance de ROR α et GATA-3 et les ILC3 sous la dépendance de ROR γ t et l'AHR (aryl hydrocarbon receptor) (Constantinides et al., 2014; Harly et al., 2018; Klose et al., 2014; Scoville et al., 2019). Cependant, plus récemment une nouvelle stratégie de développement des ILC a été proposée. En effet, cette étude aurait révélé que l'EILP et le CHILP étaient des mélanges hétérogènes de progéniteurs des lignées ILC auxiliaires et LT_i avec un potentiel de lignée restreint plutôt qu'un précurseur partagé. De plus, un précurseur spécifique de la lignée LT_i a été identifié en amont de ces populations avant l'expression de Tcf7. Ainsi, les travaux menés dans cette étude proposent que les lignées ILC et LT_i possèdent des origines distinctes aux niveaux épigénétique et fonctionnel, et fournissent une carte revisitée pour le développement des ILC (Kasal and Bendelac, 2020) (**Figure 14**).

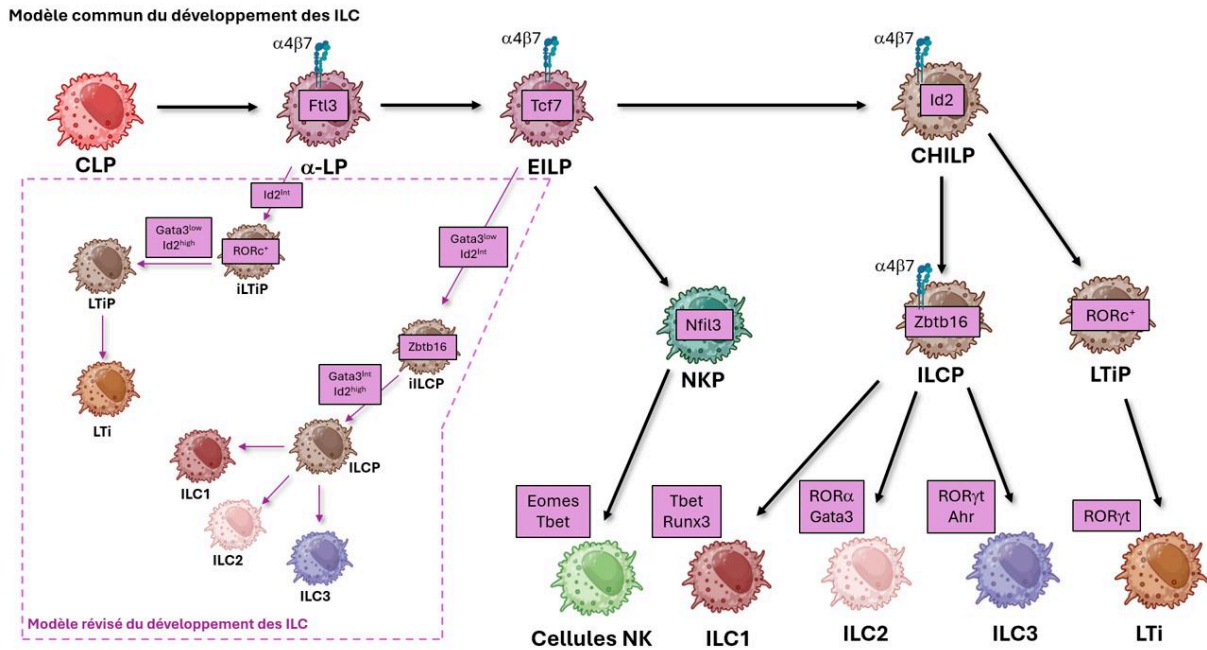


Figure 14. Développement des cellules innées lymphoïdes.

(Adaptée de Kasal and Bendelac, 2020; Scoville et al., 2019)

Dans le modèle communément décrit, les CLP donnent naissance aux α -LP, gagnant l'expression de $\alpha 4\beta 7$. Les EILP, identifiés par l'expression de Tcf7, apparaissent en aval de α LP générant tous les sous-ensembles ILC connus. Les CHILP, identifiés par une expression élevée d'Id2, se trouvent en aval des EILP et permettent le développement des cellules de la lignée ILC et LTi. Les ILCP (identifiés par l'expression de Zbtb16) et les LTiP (identifiés par Rorc) proviennent tous deux de CHILP et génèrent respectivement ILC1/2/3 ou LTi.

Dans le modèle de développement des ILC nouvellement révisé, la bifurcation dans la lignée ILC et LTi se produit au stade α -LP et EILP et est marquée par l'augmentation progressive de l'expression d'Id2. L'expression de Zbtb16 dans les iILCP et la régulation positive de Rorc dans les iLTiP, ainsi que la régulation positive différentielle de Gata3 favorisent le développement des ILCP et des LTi.

Par ailleurs, chez la souris, l'IL-7 est essentielle au développement des ILC2, ILC3 et LTi, tandis que l'IL-15 est nécessaire au développement et au maintien des cellules NK. L'IL-15 peut également être importante pour le développement des ILC1, mais certaines ILC1 sembleraient posséder une capacité de développement indépendante de l'IL-15 (Klose et al., 2014; Nagasawa et al., 2018).

Le foie fœtal et la moelle osseuse sont donc généralement considérés comme les « usines » où sont produits les différentes sous-populations d'ILC que l'on retrouve respectivement dans les tissus embryonnaires et adultes. Cependant, une étude menée chez la souris a identifié la

présence d'ILC immatures dans l'intestin du fœtus, mais également de l'adulte (Bando et al., 2015). Ces observations ont donc suggéré que des sites autres que le foie fœtal et la moelle osseuse peuvent être permissifs pour la différenciation des ILC. Par ailleurs, des études antérieures chez la souris, ont détecté le précurseur NKP à l'extérieur de la moelle osseuse (rate, sang et ganglions lymphatiques), ce qui confirme le fait que les précurseurs lymphoïdes engagés dans la lignée puissent sortir de la moelle osseuse et compléter leur différenciation en périphérie (Serafini et al., 2015). Plus récemment, des précurseurs circulants d'ILC humaines ont été découvertes (ILCP). La mise en culture de ces ILCP du sang périphérique ont donné naissance à la fois à des sous-ensembles cytotoxiques matures de NK et d'ILC auxiliaires exprimant les facteurs de transcription et sécrétant les cytokines appropriées. Cependant ces ILCP n'ont pas pu générer d'autres lignées hématopoïétiques. En approfondissant l'étude, il a été montré que ces ILCP circulantes humaines pouvaient générer des sous-populations d'ILC résidants dans les tissus *in vivo* chez les souris humanisées après transfert à des hôtes immunodéficients. Enfin, de manière intéressante, des analyses transcriptomiques et épigénétiques ont permis de constater que les ILCP circulantes humaines sont une population hétérogène constituée d'ILCP multipotentes et unipotentes pouvant donner naissance à des cellules NK, des ILC1, ILC2, ILC3 (Lim et al., 2017; Lim and Di Santo, 2019). Ainsi un nouveau modèle pour le développement des ILC a été envisagé : dans des conditions saines, les ILCP circulent dans le sang. En cas de perturbations locales (stress, inflammation, infection), la production d'IL-1 β induite par ces perturbations va permettre aux ILCP de pénétrer dans les tissus et favoriser leur expansion. Les signaux environnementaux locaux présents au niveau de chaque tissu seront en charge de guider davantage la différenciation et la rétention tissulaire appropriées des ILC (Lim et al., 2017; Lim and Di Santo, 2019; Xu et al., 2019). Par ailleurs, il a été montré de manière intéressante, que le foie de souris adulte contenait une population de cellules souches hématopoïétiques (CSL LSM) qui se différencie préférentiellement en ILC1 hépatiques résidentes des tissus. En effet, cette différenciation serait notamment due à la cytokine IFN γ produite par les ILC1 matures hépatiques. Ainsi, cette étude révèle que les ILC1 ont bien la capacité de se développer localement via une boucle dépendante de l'IFN γ (Bai et al., 2021).

b) Les 5 sous-populations d'ILC

i. Les ILC2

Les ILC2 répondent aux alarmes muqueuses telles que l'IL-25, la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP), ainsi que l'IL-33 (Van Dyken et al., 2016). Lors de l'engagement du récepteur à l'IL-33 (IL-33R) une expansion rapide ainsi qu'une réponse excessive des ILC2 est déclenchée et provoque une amplification de réponses allergiques, une hyperréactivité de la peau, des poumons et des voies respiratoires (Huang et al., 2015; Trabanelli et al., 2022). Par ailleurs, les ILC2 sont également associées à une inflammation excessive des muqueuses dans des cas d'infections. Par exemple, il a été montré que les ILC2 exacerbent les infections à *Aspergillus fumigatus* dans un modèle murin de fibrose kystique pulmonaire, par production d'IL-9 suite à leur activation par les mastocytes via la signalisation à l'IL-2 (Moretti et al., 2017). De plus, chez des souris infectées par *Cryptococcus neoformans*, l'épuisement des ILC2 conduit à la survie prolongée des souris suite à un maintien renforcé de l'activation pro-inflammatoire des macrophages pulmonaires (Kindermann et al., 2020). Le fait que les sous-ensembles d'ILC partagent des récepteurs de surface ou des facteurs de transcription communs avec la lignée définissant les cellules NK ou T conventionnelles, peut rendre l'appauvrissement ciblé de ces cellules compliqué. Il est cependant intéressant de noter qu'en ce qui concerne les ILC2, l'expression constitutive du récepteur 1 de la neuromédecine (Nmur1), leur a permis de se distinguer des autres cellules immunitaires et d'ainsi développer des modèles murins déplétés en ILC2. Par exemple, l'utilisation de souris $Nmur1^{iCre-GFP}Id2^{flox/flox}$ ou $Nmur1^{iCre-eGFP}Gata3^{flox/flox}$, ont révélé que l'infiltration d'éosinophiles au cours d'une infection par des helminthes était directement liée à la sécrétion précoce d'IL-5 par les ILC2 (Jarick et al., 2022). De plus, la déficience en ILC2 chez des souris $Klrg1^{iCre}Gata3^{flox/flox}$ entraîne un retard important dans la clairance des infections intestinales par *Nippostrongylus brasiliensis* (Gurram et al., 2023). L'ensemble de ces études révèlent un rôle essentiel des ILC2 dans le contrôle des infections par les helminthes. Les ILC2 sont également capables de produire de l'amphiréguline dans les tissus intestinaux, ce qui leur permet d'exercer un rôle protecteur et régulateur sur les épithéliums muqueux (Tsou et al., 2022). Bien que les ILC2 régulatrices jouent un rôle essentiel dans l'allergie ou l'intégrité tissulaire, leur implication potentielle lors d'infections restent ouverts.

ii. Les ILC3

Les ILC3 se localisent majoritairement au niveau de la lamina propria de l'intestin grêle et du colon, mais peuvent également être retrouvées dans d'autres tissus muqueux comme la peau. Les ILC3 comprennent deux sous-populations de cellules définies sur la base de l'expression à la surface de récepteurs cytotoxiques naturels que l'on appelle NCR pour Natural Cytotoxic Receptor. Le rôle de ces récepteurs dans l'activation des cellules NK par des cellules tumorales a été démontré il y a plus de 20 ans (Moretta et al., 2001). La famille des NCR se compose de trois molécules : NKp30 (NCR3) et NKp44 (NCR2) chez l'Homme et NKp46 (NCR1), le seul NCR conservé chez tous les mammifères (Vivier et al., 2011). NKp46 a été le premier récepteur à avoir été identifié et est notamment exprimé par les cellules NK et les ILC1 quel que soit leur localisation ou leur statut d'activation. Les ILC3 quant à elles, comprennent donc une sous-population d'ILC3 NCR⁻ et une sous-population d'ILC3-NCR⁺. Les ILC3 se sont révélées être essentielles dans la régulation de l'équilibre entre les bactéries pathogènes et commensales, notamment par leur capacité de production d'IL-22 (Cella et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008). En effet, l'IL-22 va médier un dialogue entre les ILC3 et les cellules épithéliales afin de maintenir l'intégrité de la barrière et favoriser la libération de défensines et de peptides antimicrobiens pour limiter les dommages excessifs après une infection (Van Maele et al., 2014; Zindl et al., 2022). Lors des stades précoces d'infections, les ILC3 sécrètent également de l'IL-17. (Croft et al., 2022; Song et al., 2015). Cette production d'IL-17A par les ILC3 résidentes pourraient également contribuer au contrôle et potentiellement à l'élimination de la candidose muqueuse en l'absence d'immunité adaptative (Gladiator et al., 2013). Enfin, au cours du vieillissement, la mise en place de l'immunité intestinale ainsi que la régulation de la réponse aux pathogènes va nécessiter une coopération des ILC3 avec d'autres lymphocytes (Hepworth et al., 2015; Rizk et al., 2023; Valle-Noguera et al., 2021). Par exemple, certaines ligases de l'ubiquitine E3, telles que cIAP1/2 (inhibiteur cellulaire de protéines d'apoptose 1 et 2), modulent la prolifération et la fonction des cellules T $\gamma\delta$ et des ILC3 intestinales. Les défauts de cIAP1/2 n'affecte l'immunité que progressivement au cours du temps, comprenant la production d'IL-22 liée à l'ILC3 (Rizk et al., 2023).

iii. Les LTi

Les LTi diffèrent des ILC3 par leur expression à la surface de marqueurs cellulaires tels que CCR6, CD4 et c-Kit. Elles sont notamment essentielles au développement des tissus lymphoïdes secondaires au cours de l'embryogenèse (van de Pavert, 2021).

iv. Les ILC1

Les cellules NK et les ILC1 proviennent du même progéniteur lymphoïde, expriment toutes deux de l'IFN γ et sont impliquées dans la clairance précoce des agents pathogènes intracellulaires (Seillet et al., 2021). Les cellules NK sont phénotypiquement difficiles à distinguer des ILC1, en particulier chez l'Homme, en raison de leur expression de récepteurs de surface qui se chevauchent tels que : Ly49 chez la souris/KIR chez l'Homme, DNAM-1 et NK1.1 chez la souris/CD161 chez l'Homme et NKp46, CD44, TRAIL et TIGIT. L'engagement de la lignée NK est cependant initiée par l'Eomesodermine (Eomes), tandis que les ILC1 régulent à la hausse T-bet (Tsymala and Kuchler, 2023) (**Figure 15**). Cependant, l'analyse des ILC1 dans les tissus a révélé une grande hétérogénéité et l'apparition de nouvelles sous-populations d'ILC1 possédant des exigences transcriptionnelles distinctes et complexifiant par conséquent la classification des cellules NK et des ILC1 (Riggan et al., 2019; Seillet et al., 2021). C'est pourquoi les approches de séquençage de l'ARN sont donc de plus en plus utilisées afin de mieux caractériser et différencier les cellules NK et les ILC1 (Crinier et al., 2018; Krämer et al., 2023; McFarland et al., 2021). Généralement, les ILC1 de souris se distinguent par l'absence de molécules de surface définissant la lignée comme CD19 et B220 ainsi que par l'expression de CD200r1, Syndecan-4, CD49a et le récepteur IL-7Ra (Favaro et al., 2022; Lopes et al., 2022; McFarland et al., 2021; Yudanin et al., 2019). De manière plus approfondie Krämer *et al.* ont identifié une population d'ILC1 de type « hépatique » (LT-ILC1) présentant des caractéristiques transcriptionnelles, phénotypiques et fonctionnelles distinctes de celles des cellules NK conventionnelles et hépatiques résidentes. Les LT-ILC1 ont notamment été caractérisées par l'expression des marqueurs CD49a/CD94/CD200r1 et du facteur de transcription T-bet. Cependant, ces cellules n'expriment pas le récepteur activateur NKp80 ou le facteur de transcription Eomes. D'un point de vue fonctionnel, les cellules LT-ILC1 produisent de l'IFN γ , du TNF α et du GM-CSF ainsi que de l'IL-2, mais ne sécrètent pas de perforine et de granzyme B. Des études *in vitro* ont montré que ces LT-ILC1 peuvent être

produites par des précurseurs d'ILC dérivés du sang en présence de TGF- β 1 et des cellules endothéliales hépatiques (Krämer et al., 2023). De plus, il a clairement été rapporté que le rapport T-bet/Eomes est essentiel dans l'engagement précoce des progéniteurs dans la lignée cellulaire ILC1 par rapport à la lignée cellulaire NK. En effet, les ILC1 sont dépendantes de T-bet mais pas d'Eomes, ce dernier n'étant pas exprimé dans les ILC1 de souris. Ainsi, les ILC1 résidants dans les tissus expriment tous T-bet à des niveaux élevés et sont vraisemblablement dépendants de ce facteur pour leur développement, tandis que la lignée cellulaire NK conventionnelle est classiquement définie par l'expression d'Eomes (Zhang et al., 2018) et la répression de T-bet force le développement des cellules NK Eomes⁺ (Daussy et al., 2014).

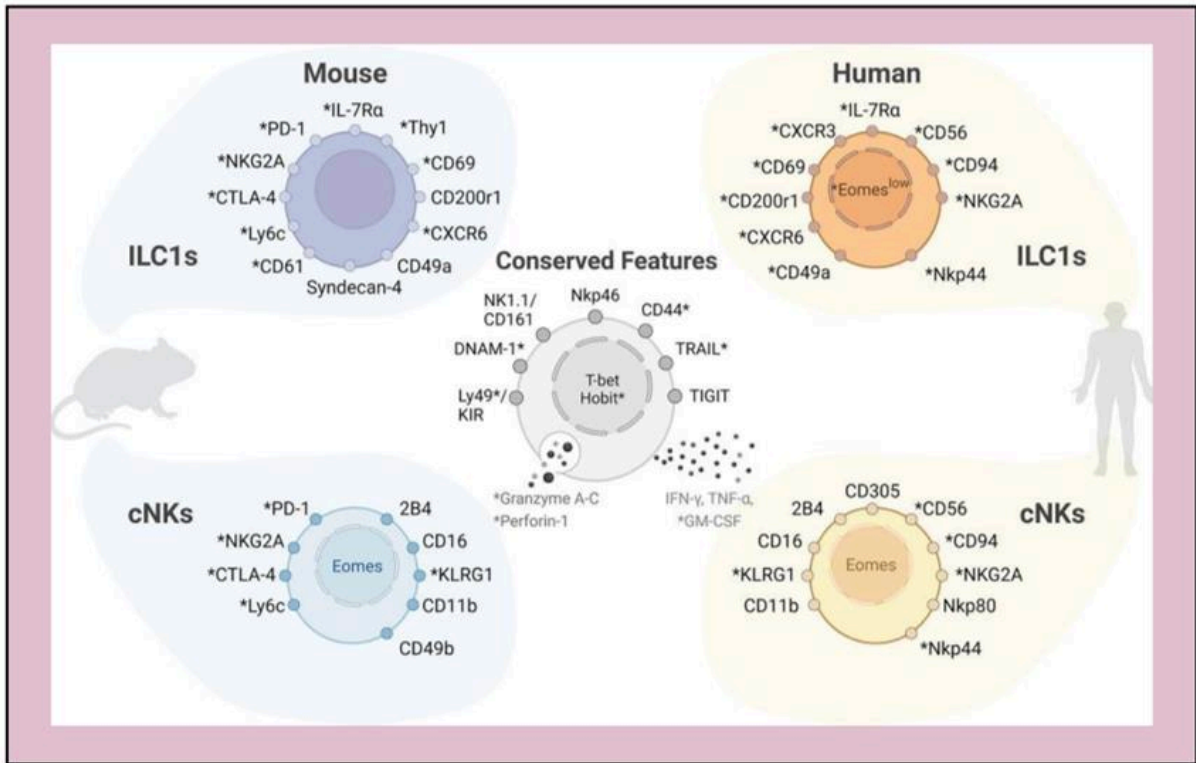


Figure 15. Les ILC1 et les cellules NK conventionnelles (cNK) expriment des récepteurs communs et distincts à la surface des cellules.

Les deux sous-populations partagent des caractéristiques interspécifiques conservées, y compris des marqueurs de surface cellulaire (récepteurs de la famille Ly49 chez la souris/récepteurs de type immunoglobuline à cellules tueuses, KIRs, chez l'homme, DNAM-1, NK1.1 chez la souris/CD161 chez l'homme, Nkp46, CD44, TRAIL, TIGIT), des facteurs de transcription (T-bet, Hobit), des caractéristiques cytotoxiques (granzyme A, B et granzyme C chez la souris, expression de la perforine) et un profil d'expression des cytokines (IFN- γ , TNF- α , GM-CSF). Les ILC1 de souris se distinguent par l'absence de molécules de surface définissant la lignée (récepteur des cellules T ou B, CD19, B220) et l'expression de CD200r1, Syndecan-4, CD49a et IL-7R α . Les ILC1 humaines négatives peuvent exprimer des Eomes à de faibles niveaux ainsi que des récepteurs de surface associés aux cellules cNK ; Les caractéristiques marquées d'un astérisque (*) ne sont présentes que dans certains environnements. cNK, NK conventionnel ; ILC, cellule lymphoïde innée. (Extrait de Tsymala and Kuchler, 2023)

Les ILC1 peuvent être amorcées par des infections qui favorisent l'acquisition de phénotypes de type mémoire (Wang et al., 2019). A la différence des lymphocytes T mémoires, les ILC1 ayant déjà rencontré des agents pathogènes peuvent présenter des schémas transcriptionnels distincts et peuvent voir augmenter l'expression de certains récepteurs comme Ly6c, IL-2R α , IL-7R α et IL-18R, leur permettant d'augmenter la sécrétion d'IFN γ lors d'une surinfection et ainsi contribuer à la résistance aux agents pathogènes (Corral et al., 2022; Pionnier et al., 2022;

Weizman et al., 2019). Cependant, la régulation transcriptionnelle des réponses des ILC1 mémoires n'est pas encore entièrement connue à ce jour. Une étude récente a cependant mis en avant le rôle important du facteur de transcription $ROR\alpha$ dans la formation des ILC1 mémoires mais également dans leur maintien au cours du temps. En effet, une déficience de $ROR\alpha$ entraîne un défaut d'expansion des ILC1 dans les ganglions lymphatiques après une sensibilisation avec des haptènes, ainsi qu'une altération de la survie à long terme des ILC1 dans le foie (Cheng et al., 2024). De manière générale, la réponse des ILC1 repose essentiellement sur la sécrétion et la signalisation de cytokines. Cependant, les ILC1 sont également capables de produire des granules cytolytiques (Di Censo et al., 2021; Nixon et al., 2022). Cette transition vers un état de cellules effectrice cytotoxique mature passe par la régulation négative de l' $IL-17R\alpha$ par Hobit (Friedrich et al., 2021). Les ILC1 partagent donc des propriétés effectrices clés avec les iNKT et les cellules NK, tandis que leurs fonctions physiologiques en tant que cellules effectrices cytotoxiques restent non résolues. En effet, leur rôle dans le contrôle d'agents pathogènes n'est pas forcément essentiel s'il est compensé par d'autres sous-ensembles cytotoxiques, y compris les cellules NK ou les cellules T cytotoxiques. Néanmoins, la sécrétion d' $IFN\gamma$ par les ILC1 entrave la réplication virale dans divers modèles murins (Shannon et al., 2021; Trittel et al., 2019) et leur localisation sur les sites de barrières épithéliales leur confère le rôle de première ligne de défense de l'organisme, agissant même avant les cellules NK cytotoxiques et offrant un avantage crucial à la défense de l'hôte. Cependant, il a été montré que des souris infectées avec le CMV (cytomégalovirus) présentaient une proportion d'ILC1 hépatiques diminuée. Cette disparition des ILC1 est essentiellement due à leur entrée en apoptose, provoquée par l'acide lactique considérablement augmenté par l'inflammation hépatique induite par le MCMV. En parallèle, les taux hépatiques de lactate déshydrogénase (LDH), qui intervient dans la conversion bidirectionnelle du pyruvate et du lactate, ont été mesurés. La LDHA catabolise le pyruvate en lactate, tandis que la LDHB convertit le lactate en pyruvate. En accord, avec l'augmentation du lactate observé, des taux élevés de LDHA ont été détectés. L'ensemble de ces données, indiquent que les niveaux de lactate induits par le MCMV dans le foie affectent de 2 manières différentes les cellules NK et les ILC1. Ainsi, à la suite d'une infection virale, les ILC1 présentent une altération de la fonction mitochondriale ce qui entraîne une plus grande sensibilité au lactate et mène au phénomène d'apoptose (Dodard et al., 2020).

v. Les cellules NK

Ce n'est qu'en 1975 que Kiessling, Herberman et leurs collaborateurs mirent en évidence la première population de cellules lymphocytaires innées : les cellules tueuses naturelles (cellules NK). Ces cellules possédaient une activité lytique dirigée contre des cellules leucémiques cultivées *in vitro* (Kiessling et al., 1975). Depuis, les cellules NK ont été décrites pour leur rôle crucial dans la reconnaissance et l'élimination des cellules malignes ou infectées. Par ailleurs, les cellules NK sont également des cellules régulatrices engagées dans les interactions avec les autres cellules immunitaires comme les macrophages et les lymphocytes T, mais également les cellules endothéliales. Les cellules NK sont localisées dans la plus part des organes lymphoïdes (ganglions lymphatiques, moelle osseuse, rate, thymus), non lymphoïdes (foie, poumons, utérus) et patrouillent également dans l'organisme (Vivier et al., 2008). La majorité des études publiées s'intéressent tout de même principalement au rôle des cellules NK dans divers types de cancers. Leur activité contre les cellules cibles peut être modulée par l'expression de leurs divers récepteurs activateurs/inhibiteurs, mais également par stimulation cytokinique (IL-2, IL-15, IL-12, IL-18) (Shin et al., 2023). Il a été démontré que la présence de cellules NK sur le site tumoral est corrélée à un meilleur pronostic, ce qui suggère leur rôle important dans la prévention du cancer et l'immunosurveillance, notamment grâce à leur activité cytotoxique (Chiossone et al., 2018; Gras Navarro et al., 2015). En ce qui concerne leur capacité de production d'IFN γ , celle-ci leur confère un rôle crucial dans l'élimination directe des cellules infectées par des virus. Par ailleurs, le nombre de cellules NK est inversement associé à la gravité et à la récurrence des infections virales chez l'Homme (Deng et al., 2021). Ainsi, l'activité des cellules NK repose bien sur 2 mécanismes : la réponse cytotoxique (elle-même divisée en deux voies) et la sécrétion cytokinique.

▪ *La réponse cytotoxique par relargage de granules lytiques*

Les granules lytiques sont chargés de granzymes et de perforine. Les granzymes sont des protéases à serine, qui se trouvent sous leur forme active lorsqu'elles sont stockées dans les granules. Cependant, leur activité est inhibée par l'environnement acide du milieu (Raja et al., 2002). La perforine est une protéine qui permet la formation de pores et dont l'activité est dépendante de sa polymérisation ainsi que de la disponibilité en Ca $^{2+}$ (Voskoboinik et al., 2005). Lorsqu'elles sont dans les granules, leur activité est également inhibée en raison du faible pH (Praper et al., 2010). Lorsque le contenu des granules lytiques est libéré on parle de

« dégranulation ». Au moment de la dégranulation, les cellules NK vont réguler à la hausse et de manière transitoire la protéine de la membrane associée au lysosomes-1 (LAMP-1 ou CD107a) et LAMP-2 (CD107b). La détection de ces marqueurs par cytométrie en flux est souvent utilisée comme une mesure indirecte de l'activité cytotoxique des cellules NK. D'un point de vue mécanistique, la dégranulation commence par la formation d'une synapse immunologique entre la cellule NK et sa cellule cible, ainsi que par la réorganisation du cytosquelette (Mace et al., 2012). Le centre organisateur des microtubules (centrosome) et les granules sécrétoires se polarisent vers la synapse immunologique. Ensuite, les granules s'amarrent, puis fusionnent avec la membrane plasmique de la cellule cible, offrant ainsi à la perforine le pH neutre de l'espace extracellulaire (Stinchcombe et al., 2006). Par ailleurs, la présence de Ca^{2+} active la perforine qui se lie à la membrane et s'agrège en polymères afin d'induire la formation de pores par lesquels les granzymes pénètrent dans la cellule cible. Les granzymes peuvent alors induire l'apoptose de plusieurs manières. La granzyme B (GzmB) est la granzyme la plus étudiée. Elle est notamment connue pour cliver la caspase-3 et la caspase-7 après leurs résidus d'acide aspartique, conduisant leur activation et le déclenchement d'une mort cellulaire dépendante de la caspase (Fischer et al., 2003). La Granzyme B peut également induire la mort par le clivage de la protéine Bid (Sutton et al., 2000). Les cellules NK peuvent également induire une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) via le récepteur $Fc\gamma RIIIa$, également connu sous le nom de CD16, contre les cellules opsonisées (Ochoa et al., 2017).

- *La réponse cytotoxique médiée par les récepteurs de mort*

L'engagement des récepteurs de mort fait partie des processus par lesquels les cellules NK éliminent leur cible (Prager and Watzl, 2019). Les cellules NK activées expriment à leur surface les protéines transmembranaires de type II : TRAIL et FasL, qui vont pouvoir s'engager respectivement avec les récepteurs TRAIL (TRAILR) et Fas (CD95) présents à la surface des cellules cibles (Montel et al., 1995; Vanamee and Faustman, 2018). Les liaisons FasL/CD95 ou TRAIL/TRAIL-R, entraînent l'assemblage du complexe de signalisation induisant la mort (DISC), qui active l'apoptose par l'intermédiaire de la caspase-8 et 10 pour le système FasL/CD95 et uniquement de la caspase 8 pour le système TRAIL/TRAIL-R (von Karstedt et al., 2017).

- *La sécrétion cytokinique*

Enfin, la sécrétion de cytokines et d'autres facteurs inflammatoires constituent également un mécanisme de la réponse immunitaire des cellules NK. Les cellules NK produisent principalement des cytokines de type Th1 comme l'IFN γ , le TNF α et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes/monocytes (GM-CSF). L'IFN γ dérivé de cellules NK est capable d'induire l'expression de récepteurs de mort sur les cellules cibles, ce qui indique que les deux fonctions effectrices des cellules NK peuvent être simultanées. Par ailleurs, l'IFN γ a un rôle essentiel dans les réponses antitumorales et antivirales, en particulier en favorisant la différenciation des cellules T CD4⁺ en cellules Th1 et en favorisant la polarisation des monocytes vers un phénotype pro-inflammatoire. En ce qui concerne le TNF α , il favorise notamment le recrutement des neutrophiles et des lymphocytes et participe à la régulation de la production d'autres cytokines inflammatoires comme l'IL-1 et IL-6.

- *Fonctions effectrices et métabolisme des cellules NK*

Les voies métaboliques sont régulées par des signaux intrinsèques et extrinsèques afin de répondre aux besoins énergétiques pour la croissance, la survie et les fonctions spécialisées des cellules (O'Neill et al., 2016). La glycolyse et la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS) sont les principales voies métaboliques de la génération d'ATP et sont toutes deux alimentées par le glucose. Le glucose est d'abord converti en pyruvate par la glycolyse, puis métabolisé en lactate ou transporté dans les mitochondries pour l'OXPHOS. La glutamine et les acides gras (AG) peuvent également alimenter l'OXPHOS par glutaminolyse et oxydation des acides gras (FAO). La glycolyse va générer 2 molécules d'ATP à partir d'une molécule de glucose. L'OXPHOS va produire 36 molécules d'ATP à partir d'une seule molécule de glucose. Cependant, la glycolyse reste une voie métabolique capable de produire rapidement de l'énergie et est impliquée dans la survie et la prolifération rapide des cellules (Vander Heiden et al., 2009; Wang et al., 1976).

Récemment, il a été mis en évidence que le métabolisme soutenait de nombreux aspects de la biologie des cellules innées lymphoïdes (ILC) et notamment la régulation de leurs fonctions effectrices (L. Zhou et al., 2022). Par exemple, en réponse à une stimulation à l'IL-25 et l'IL-33, les ILC2 activées utilisent l'Arginase 1 (Arg1) pour métaboliser la L-arginine extracellulaire en polyamines afin d'alimenter la glycolyse (Monticelli et al., 2016). Par ailleurs les ILC2 peuvent absorber des acides gras extracellulaires et utiliser l'oxydation des acides gras (FAO)

mitochondriale pour alimenter la prolifération et leurs fonctions effectrices pendant une infection par des helminthes (Wilhelm et al., 2016). Pour les ILC3 activées par l'IL-23 ou l'IL-1 β , le métabolisme du glucose est augmenté et les ILC3 présentent une consommation accrue d'oxygène mitochondriale. Par ailleurs, les ILC3 ont besoin que la signalisation PD1 soit intacte afin d'obtenir une activité glycolytique importante et favoriser la production de cytokines effectrices (Di Luccia et al., 2019; Fachi et al., 2021). En ce qui concerne les ILC1, ce domaine de recherche nécessite des recherches approfondies, mais étant donné que les ILC1 présentent un transcriptome et des fonctions effectrices proches à ceux des cellules NK, il est possible de supposer que le profil métabolique des ILC1 ressemble à celui des cellules NK. Par ailleurs, le métabolisme des cellules NK reste l'aspect le plus étudié actuellement. En effet, les cellules NK activées présentent notamment une reprogrammation métabolique capable de réguler leurs fonctions cytotoxique et cytokinique. A l'état d'équilibre, les cellules NK murines présentent un phénotype métaboliquement quiescent qui utilise préférentiellement l'OXPPOS alimenté par le glucose et qui permet de répondre à leurs besoins énergétiques. Dans des contextes d'activation à court terme, par des cytokines ou par l'intermédiaire des récepteurs activateurs aucune reprogrammation métabolique n'est nécessaire pour activer les réponses effectrices des cellules NK (Keppel et al., 2015; Marçais et al., 2013). Dans les cellules NK non stimulées du sang périphérique humain de faibles niveaux de glycolyse et d'OXPPOS ont également été constatés (Keating et al., 2016).

Chez l'Homme, les cellules NK sont divisées en deux sous-ensembles : les CD56^{ldim} et les CD56^{bright}, possédant des propriétés métaboliques distinctes, qui expliquent en partie leur différence. Lorsque les cellules NK CD56^{bright} sont activées par des cytokines, elles présentent des changements métaboliques plus prononcés et sont également plus sensibles à l'inhibition du métabolisme que les cellules NK CD56^{ldim} (Keating et al., 2016). De plus, les populations de cellules NK CD56^{bright} sont localisées à la fois dans le sang et dans les tissus de manière résidente. De ce fait, les cellules CD56^{bright} localisées dans le foie et dans la rate présentent un niveau d'expression diminué pour le transporteur du glucose Glut1, mais voient cependant augmenter l'expression du récepteur aux nutriments CD98 après une stimulation IL-12/IL-15, par rapport aux cellules NK CD56^{bright} situées dans le sang périphérique humain (Salzberger et al., 2018). Ces données mettent donc en lumière, le fait que les cellules NK possèdent des préférences pour des nutriments particuliers en fonction de leur compartiment et de leur environnement.

Chez la souris, l'activité métabolique des cellules NK change dynamiquement au cours du développement. En effet, lorsque les cellules NK sont immatures leur activité métabolique est augmentée afin de pouvoir soutenir leur expansion proliférative. Au fur et à mesure que les cellules NK murissent, les voies liées à la prolifération diminuent, tandis que les voies associées à la quiescence sont régulées à la hausse (Marçais et al., 2014). Au cours de leur maturation, les cellules NK subissent un processus d'éducation généralement médié par les récepteurs inhibiteurs (Ly49 pour la souris/KIR chez l'Homme), qui leur permet d'acquérir leur compétence fonctionnelle et de distinguer des cellules normales des cellules anormales. *Marçais et al.* ont mis en évidence que la cible mTOR (mammalian target of rapamycin) est essentielle à l'éducation des cellules NK et une activité augmentée de mTOR dans les cellules NK éduquées permet le maintien de leur réactivité optimale et de leurs paramètres métaboliques (Marçais et al., 2017).

La régulation métabolique dans les cellules NK est ainsi pilotée par de nombreux mécanismes et acteurs moléculaires complexes, parmi lesquels la sérine thréonine kinase mTOR est le plus largement étudié. mTOR est connu pour fonctionner selon deux complexes différents : mTORC1 et mTORC2. L'activité de mTORC1 est connue pour être impliquée dans l'homéostasie, la maturation et la régulation des fonctions des cellules NK, tandis que mTORC2 a été pour le moment décrit comme étant essentiel à la maturation terminale des cellules NK (Yang et al., 2018). Lorsque les cellules NK sont activées, l'augmentation de la glycolyse et des fonctions mitochondriales est principalement régulée par l'activité de mTOR. Il a notamment été montré que l'utilisation de la rapamycin, inhibiteur de mTOR, entraînait une diminution de la glycolyse dans des cellules NK stimulées par l'IL-12/IL-2 (Donnelly et al., 2014), ainsi qu'une diminution de la masse mitochondriale et du potentiel membranaire dans les cellules NK humaines stimulées par l'IL-2 (Slattery et al., 2021), entraînant alors l'altération des fonctions effectrices. mTOR joue également un rôle dans la régulation métabolique des cellules NK en interagissant avec d'autres molécules comme : Srebp et cMyc qui contrôlent notamment la reprogrammation métabolique induite par l'activation des cellules NK. mTOR va être nécessaire pour que l'activité de Srebp soit optimale (Assmann et al., 2017) et pour l'induction initiale de cMyc (Loftus et al., 2018).

Après de longues stimulations IL-12/IL-2, les cellules NK activées voient leur glycolyse, l'absorption du glucose et la synthèse des lipides augmentées (Assmann et al., 2017; Donnelly et al., 2014). Le glucose est le principal carburant des cellules NK. Comme je l'ai précédemment

décrit, une fois introduit dans la cellule, le glucose va être converti en pyruvate, puis une partie du pyruvate sera convertie en lactate. Cependant, contrairement à d'autres cellules immunitaires et notamment aux lymphocytes, quasi aucun pyruvate ne va emprunter le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). En effet, au sein des cellules NK, le pyruvate va être métabolisé en citrate cytosolique par la « navette citrate-malate » (CMS), dans le but d'alimenter la synthèse de l'OXPLOS et d'ATP contrôlé par Srebp (Assmann et al., 2017). Il est important de noter qu'en ce qui concerne les cellules NK, l'inhibition des voies de la synthèse des lipides a très peu d'effets sur leurs fonctions effectrices à la différence des lymphocytes T effecteurs qui se voient fortement impactés (Berod et al., 2014; Kidani et al., 2013).

La glutamine est également bien connue pour être un carburant des cellules métaboliquement actives puisque la glutaminolyse alimente le TCA. Cependant, les cellules NK activées, n'utilisant que très peu cette voie, la glutamine ne représente donc pas un carburant essentiel pour alimenter l'OXPLOS, mais elle reste tout de même essentielle au métabolisme des cellules NK, puisqu'elle contribue au maintien des niveaux de cMyc (Loftus et al., 2018). cMyc va notamment jouer un rôle dans le contrôle de l'expression de la machinerie métabolique, y compris les transporteurs de glucose et les enzymes glycolytiques, qui sont essentiels pour soutenir l'augmentation du métabolisme pendant l'activation des cellules NK. La glutamine va donc participer à l'absorption des acides aminés essentiels à des taux élevés de synthèse de la protéine cMyc, par l'intermédiaire du transporteur d'acides aminés SLC7a5. Le retrait de la glutamine ou le blocage du transport des acides aminés entraînent une perte de cMyc et par conséquent une altération des fonctions effectrices des cellules NK (Loftus et al., 2018).

Il est également important de préciser que l'IL-15 peut également influencer les fonctions effectrices des cellules NK en fonction de la dose utilisée. En effet, à de faibles concentrations, l'IL-15 va agir comme un facteur de survie, tandis qu'à une concentration élevée, l'IL-15 va influencer la prolifération (Fehniger et al., 2007; Lee et al., 2011). Enfin, l'utilisation répétée d'une dose importante d'IL-15 peut également activer les cellules NK, et par conséquent entraîner l'augmentation des voies métaboliques et en particulier la glycolyse, puisque l'IL15 à de fortes doses déclenche l'activation de mTOR (Keppel et al., 2015; Marçais et al., 2014). Pour récapituler, les cellules NK activées utilisent préférentiellement le glucose qui est métabolisé par la glycolyse et la CMS, afin d'alimenter les fonctions effectrices. Ainsi l'activation métabolique est primordiale pour que les cellules NK soient en capacité de produire des protéines effectrices (IFN γ et Granzyme B) afin de former une synapse immunologique

correcte avec la cellule cible (O'Brien and Finlay, 2019) (**Figure 16**). Cependant, la dérégulation du métabolisme des cellules NK peut donc entraîner leur dysfonctionnement et est le plus souvent associé à des pathologies comme : le cancer (Cong et al., 2018; Slattery et al., 2021), l'infection virale (Moreno-Cubero et al., 2024), ou l'obésité (Michelet et al., 2018). En effet, l'inhibition du métabolisme cellulaire est le plus souvent associée au dysfonctionnement des cellules NK. C'est notamment le cas lors de cancers, où l'on retrouve dans le microenvironnement tumoral une régulation à la hausse du TGF β connu pour avoir un impact négatif sur la fonction des cellules NK. Il a été mis en évidence dans un modèle de cancer du poumon, que l'enzyme gluconéogène fructose-1,6bisphosphate (FBP1) est induite de manière aberrante chez les cellules NK d'une manière dépendante au TGF β , provoquant ainsi la suppression de la glycolyse et par conséquent un dysfonctionnement des cellules NK (Cong et al., 2018). D'autre part, Slattery *et al.* ont constaté que les cellules NK du sang périphérique de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique présentaient une activité de mTOR altérée. Le blocage *ex vivo* d'un taux élevé de TGF β améliore cependant l'activité de mTOR, ainsi que d'autres paramètres métaboliques et la production d'IFN γ par les cellules NK chez ces patientes (Slattery et al., 2021). En ce qui concerne les infections virales, une étude récente a montré que lors d'une infection chronique par le VIH-1, les cellules NK possédaient des anomalies métaboliques. En effet, les cellules NK présentent un dysfonctionnement mitochondrial avec une OXPHOS défectueuse et des mitochondries fragmentées, ce qui limite leur capacité à mobiliser des carburants alternatifs pour alimenter leur production d'IFN γ (Moreno-Cubero et al., 2024). Dans le sang périphérique de patients atteints d'obésité les cellules NK présentent une cytotoxicité diminuée ainsi qu'une production d'IFN γ altérée (Michelet et al., 2018; Tobin et al., 2017). Par ailleurs, Michelet *et al.* ont notamment montré de quelle manière l'obésité était capable d'affecter la fonction des cellules NK par l'intermédiaire de la régulation du métabolisme cellulaire intrinsèque. En effet, l'obésité induit une activation robuste du récepteur activé par les proliférateurs de peroxydase (PPAR) qui contribue à l'absorption des lipides dans les cellules NK. Cette accumulation de lipides, entraîne l'inhibition des régulateurs du métabolisme tels que mTOR et cMyc, mais inhibe également la reprogrammation métabolique nécessaire à la mise en place des fonctions effectrices des cellules NK (Michelet et al., 2018).

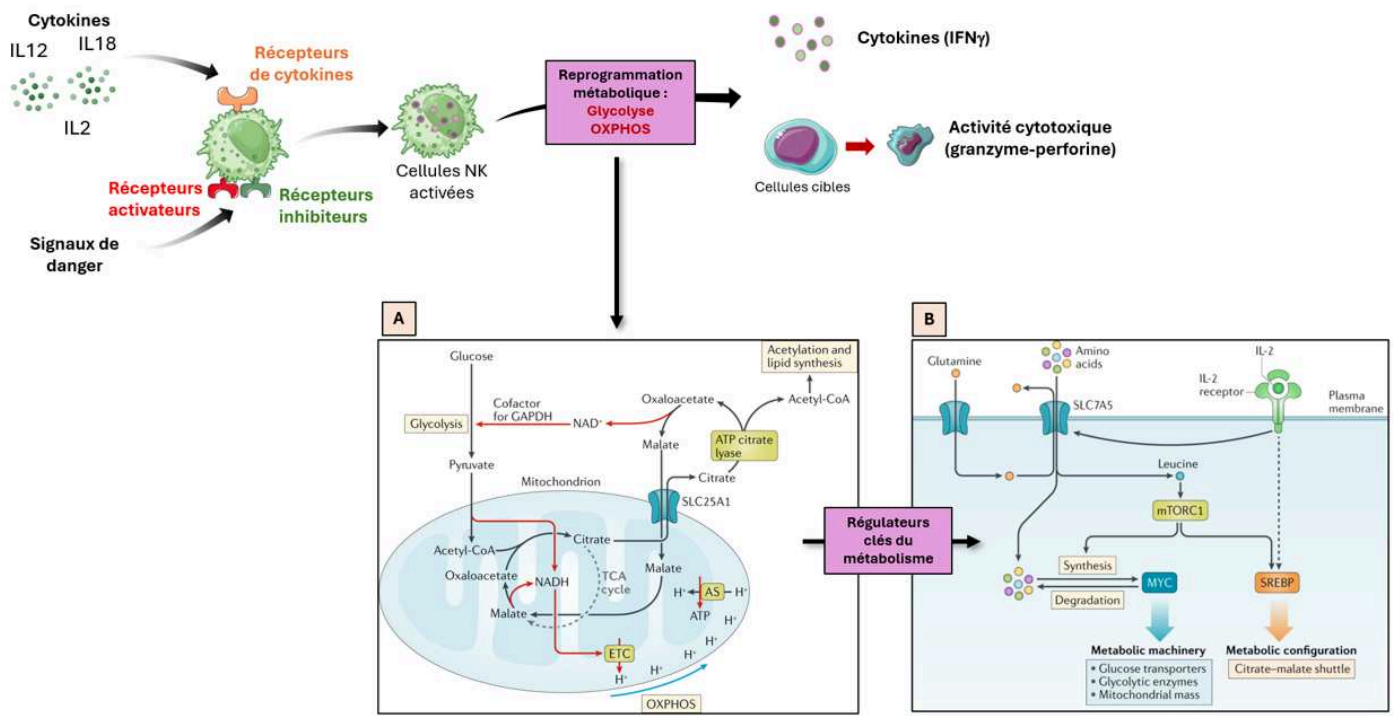


Figure 16. Fonctions effectrices et métabolisme des cellules NK.

L'activation des cellules NK génère une reprogrammation de leur activité métabolique. La glycolyse et la phosphorylation oxydative sont les deux voies touchées lors de cette reprogrammation. **(A)** Le glucose est métabolisé en acétyl-CoA mitochondrial, ce qui réduit le NADH. L'acétyl-CoA se combine avec l'oxaloacétate pour fabriquer du citrate mitochondrial, qui est ensuite exporté des mitochondries à travers l'antiporteur citrate-malate SLC25A1. Dans le cytosol, le citrate est métabolisé par l'ATP citrate lyase, générant de l'acétyl-CoA cytosolique et de l'oxaloacétate, qui peuvent être convertis en malate dans une réaction qui oxyde le NADH pour produire du NAD. Le maintien du NAD dans le cytosol est essentiel à la poursuite de la glycolyse, car il s'agit d'un cofacteur essentiel de la GAPDH. Le malate rentre dans les mitochondries par SLC25A1, où il est reconverti en oxaloacétate, produisant une deuxième molécule de NADH dans les mitochondries. L'oxaloacétate peut alors réagir avec une autre molécule d'acétyl-CoA dérivée du glucose pour former une autre molécule de citrate complétant ainsi le cycle. De cette façon, la navette citrate-malate génère deux molécules de NADH par molécule de pyruvate qui pénètre dans les mitochondries, qui alimentent la chaîne de transport d'électrons (ETC) conduisant à la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et à la synthèse de l'ATP via l'ATP synthase (AS). **(B)** Deux facteurs de transcription ont été identifiés comme des régulateurs métaboliques clés dans les cellules tueuses naturelles (NK) de souris : MYC et la protéine de liaison aux éléments régulateurs des stérols (SREBP). Après une stimulation cytokinique, les niveaux de protéine MYC s'accumulent d'une manière dépendante de la cible mammifère du complexe de rapamycine 1 (mTORC1). mTORC1 est activé par la signalisation cytokinique et peut augmenter la traduction de la protéine MYC. La stimulation des cytokines induit également l'expression et l'activité du transporteur d'acides aminés SLC7A5. À des moments ultérieurs après la stimulation des cytokines, l'absorption des acides aminés par SLC7A5 est essentielle pour maintenir les niveaux de protéines MYC, alors que l'activité de mTORC1 n'est pas nécessaire. Le retrait de la glutamine, qui est exportée par SLC7A5 pour soutenir l'importation d'acides aminés dépendants de SLC7A5. Bien que l'absorption de leucine par SLC7A5 soit nécessaire à l'activité de mTORC1 à ces derniers moments, le retrait de la leucine n'est pas suffisant pour réduire l'expression de MYC. Par conséquent, l'absorption d'autres acides aminés, tels que la méthionine, la phénylalanine, la tyrosine, l'arginine ou le tryptophane, par SLC7A5 est importante dans la régulation de MYC. L'activité de SREBP est considérablement augmentée après stimulation cytokinique dans les cellules NK de souris. Bien que mTORC1 soit le principal régulateur de l'activation de SREBP, d'autres mécanismes contribuent également à l'activité de SREBP dans les cellules NK stimulées par les cytokines. MYC est important pour l'expression de la machinerie métabolique dans les cellules NK, et SREBP contrôle la configuration métabolique, à savoir le métabolisme du glucose par la navette citrate-malate.

c) Rôle des cellules NK/ILC1 dans les MASLD

Le rôle protecteur ou pathogène des cellules NK et des ILC1 dans la MASH/MASLD a longtemps fait l'objet de débats. Cela peut être dû à la difficulté de les distinguer l'une de l'autre. Cependant, des études ont tout de même mis en évidence le rôle fondamental des cellules NK et des ILC1 dans les processus inflammatoires de cette pathologie au sein des différents organes cibles comme le tissu adipeux, l'intestin et le foie.

i. Cellules NK et ILC1 dans le tissu adipeux au cours de la MASLD

Chez l'Homme, plusieurs études ont révélé une réduction évidente du nombre de cellules NK dans le sang périphérique d'adultes ou d'adolescents atteints d'obésité (Tobin et al., 2017; Viel et al., 2017). De plus, les modèles murins d'obésité démontrent une accumulation de cellules NK dans le tissu adipeux (Lee et al., 2016; Wensveen et al., 2015). Les adipocytes vont jouer un rôle important dans l'activation des cellules NK. Lorsque l'obésité survient, la surcharge en nutriments va engendrer un stress cellulaire qui va favoriser la sécrétion de CCL2 par les adipocytes. CCL2 est un puissant attractant pour les monocytes et les macrophages, mais va également être impliqué dans le recrutement de cellules NK au niveau du tissu adipeux (Bähr et al., 2020). Ces cellules NK expriment des niveaux plus élevés de récepteurs d'activation, notamment NKG2D, CD158 et NKp46. De plus, l'obésité entraîne une régulation positive d'un ligand (non identifié) du récepteur activateur des cellules NK NKp46 sur les adipocytes ce qui favorise la prolifération et l'activation des cellules NK (Wensveen et al., 2015). Dans des conditions physiologiques, les macrophages sont les cellules immunitaires les plus dominantes dans le tissu adipeux et ont un phénotype qui régule les facteurs anti-inflammatoires. Cependant l'obésité introduit une transition phénotypique dans les macrophages vers une transition pro-inflammatoire (Lumeng et al., 2007) entraînant une augmentation de la sécrétion de chimiokines qui vont participer au recrutement des cellules NK mais également potentialiser l'activation des cellules NK en régulant à la hausse l'expression de RAE-1 ligand du récepteur activateur NKG2D (Boulenouar et al., 2017). Les cellules NK activées dans le tissu adipeux dans un contexte d'obésité participent également à leur tour à la formation de l'environnement inflammatoire, en particulier l'état d'activation des macrophages résidents du tissu adipeux. En effet, les cellules NK représenteraient environ 45% de la population productrice d'IFN γ dans le tissu adipeux, ce qui favorise et maintient le phénotype pro-inflammatoire des macrophages

et l'expression des gènes inflammatoires dans les adipocytes (Lee et al., 2016; Wensveen et al., 2015). Cependant, il a été rapporté que l'influence de l'obésité sur les cellules NK, ainsi que l'interaction entre les cellules NK et les macrophages résidents du TA ne se produit que dans le TA épидидymaire et non sous-cutané de souris C57BL/6 (Lee et al., 2016). La raison pour laquelle les NK présentent une sélectivité pour une région du tissu adipeux n'est pas claire, mais les composants distincts et le microenvironnement du tissu adipeux peuvent avoir de l'importance. Enfin, des études ont également mis en évidence qu'au stade précoce de l'obésité, l'augmentation des niveaux de leptine et la diminution de l'adiponectine améliorent l'activation des cellules NK et contribuent au développement et à l'exacerbation de la réponse inflammatoire dans le TA. Cependant lorsque l'obésité persiste sur le long terme, l'accumulation de leptines ou de lipides intracellulaires peuvent également entraîner une paralysie immunitaire des cellules NK (Matsubara et al., 2002; Renehan et al., 2015).

ii. Cellules NK et ILC1 dans l'intestin au cours de la MASLD

Au niveau intestinal, les cellules NK et les ILC1 ont été identifiés dans l'épithélium et dans la lamina propria contrairement aux ILC3 et ILC2 qui se trouvent uniquement dans la lamina propria. On retrouve donc des ILC1 intraépithéliales (CD49a⁺ Eomes⁺) et des ILC1 résidentes de la lamina propria (CD49a⁺ CD127⁺ Eomes⁻) qui se distinguent des cellules NK (CD49a⁻ Eomes⁺ CD127⁻) (Fuchs, 2016). Le rôle des ILC1 dans la prévention des infections par des agents pathogènes intestinaux opportunistes (*Toxoplasma gondii*) est bien connu, notamment par leur capacité à produire de l'IFN γ et du TNF α (Klose et al., 2014). Toutefois, la production d'IFN γ produit par les cellules NK contribue à limiter la dissémination bactérienne (Reynders et al., 2011). La barrière intestinale étant affectée au cours de la MASLD, le dialogue entre les cellules NK, les ILC1 et les cellules épithéliales peut se retrouver altéré de même que la fonctionnalité des ILC. En effet, suite à un dommage de la barrière épithéliale, les ILC1 produisent de l'IFN γ qui permet la production de certaines chimiokines par les cellules épithéliales comme CXCL10 et CXCL11. En retour ces chimiokines vont donc recruter au niveau intestinal un plus grand nombre de cellules NK et d'ILC1 qui vont assurer la mise en place d'une réponse immunitaire protectrice (Bostick and Zhou, 2016; Groom and Luster, 2011).

iii. Cellules NK et ILC1 dans le foie au cours de la MASH

Comme je l'ai précédemment décrit dans ce manuscrit, les cytokines IL-12, IL-15, IL-18 jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'activité et de l'homéostasie des cellules NK et des ILC1. De manière intéressante, une étude a mis en évidence chez des souris déficientes pour l'IL15 (IL15-KO) et nourries avec un régime HFD, une diminution de la stéatose hépatique et de l'expression de chimiokines hépatiques (CCL2, CCL5, CXCL10) qui sont impliquées dans le recrutement des cellules NK (Cepero-Donates et al., 2016). Par ailleurs, dans cette même étude, le nombre de cellules NK dans le foie se voit être diminué par rapport aux souris du groupe contrôle. Bien que seulement corrélatifs, ces résultats suggèrent que l'absence d'IL-15 pourrait affecter la biologie des cellules NK ainsi que celles d'autres types de cellules immunitaires comme les cellules NKT et/ou les sous-populations de cellules T CD8. Ainsi, bien que l'IL-15 soit une cytokine clé pour le développement et la biologie des cellules NK, une surproduction locale d'IL-15 semble être délétère au cours de la MASH et suggèrent par la même occasion un rôle pathogénique des cellules NK. Plus récemment, une étude a confirmé que les cellules NK activées favorisaient la MASH dans des modèles murins soumis à un régime MCDD ou HFD (Wang et al., 2022). Pour cela, ils ont utilisé des souris *Nfil3-KO* (Facteur nucléaire régulé par l'IL-3) afin d'obtenir un modèle murin où les cellules NK sont éliminées et les ILC1 conservées dans le foie. En nourrissant ces souris avec des différents régimes inducteurs de MASH, une réduction de la stéatose, de l'inflammation et des lésions hépatiques a été constatée. De manière intéressante, ils ont également montré que ce mécanisme de protection qu'ils observaient était étroitement lié à une réduction de la signalisation JAK-STAT et NF- κ B dans les hépatocytes. En ce qui concerne actuellement le rôle des cellules ILC1 au cours de la MASH aucune étude n'a clairement pu l'élucider. Cependant, une étude de Tosello-Trampont *et al.* suggère que les ILC1 pourrait potentiellement jouer un rôle protecteur pendant le développement de la MASH. En effet, l'épuisement des cellules NKp46 (cellules NK et ILC1), productrices IFN γ , chez des souris nourries avec un régime MCDD, entraîne une exacerbation de la MASH ainsi qu'une progression vers la fibrose (Tosello-Trampont et al., 2016). Cette exacerbation est étroitement liée à une augmentation de la mort des cellules hépatiques, de l'inflammation et de l'expression des signaux de danger. Par ailleurs, la progression vers la fibrose s'expliquerait par une perte de la polarisation des macrophages inflammatoires due à une diminution de la production d'IFN γ par les cellules NKp46. Les cellules NK ayant été décrites comme pathogéniques, il se pourrait alors que les résultats

observés dans cette étude de Tosello-Tramont, soient donc dus à un rôle protecteur des ILC1 au cours de la MASH par l'intermédiaire de la production d'IFN γ .

iv. Cellules NK et ILC1 au cours de la fibrose hépatique

Etant donné que les ILC n'ont été identifiées que récemment, peu d'études ont étudié leur rôle dans la pathogenèse de la fibrose induite par une agression métabolique. Les études se sont donc basées sur l'utilisation de modèles murins de lésions hépatiques induites par l'administration de composés hépatotoxiques, tels que le CCL4. Les cellules NK est la sous-population d'ILC la plus étudiée dans le développement de la fibrose et semblerait présenter un rôle protecteur en induisant notamment la mort des HSC. En effet, les HSC expriment de manière différentielle à leur surface des ligands, comme RAE-1, capables d'être reconnus par les récepteurs activateurs tels que NKG2D. Cette reconnaissance ligand-récepteur, entraîne l'activation des voies de mort cellulaire et favorise ainsi l'apoptose des HSC (Gur et al., 2012; Jeong et al., 2006; Radaeva et al., 2006). De plus, l'expression du CMH de classe I par les HSC est diminuée dans les lésions hépatiques. Les cellules NK, exprimant des récepteurs qui peuvent se lier aux protéines du CMH-I, comme KIR chez l'Homme et Ly49 chez la souris, voient alors l'activité *KIR* de leur récepteur diminuée ce qui entraîne une destruction des HSC par l'augmentation de l'activité des cellules NK (Muhanna et al., 2011). D'autres mécanismes impliquent l'activité anti-fibrotique de l'IFN γ qui inhiberait la prolifération des HSC par l'activation de STAT1 et l'atténuation de la signalisation du TGF β (Jeong et al., 2006). Les sources de production d'IFN γ pourraient être les cellules NK hépatiques ainsi que les ILC1, ce qui rend les deux types de cellules importants dans la résolution ou la prévention de les maladies hépatiques chroniques. Par ailleurs, l'étude menée par Tosello-Tramont, que j'ai précédemment abordé dans la dernière sous partie, met en évidence que l'épuisement des cellules NK et des ILC1 favorise une alternative de polarisation des macrophages activés au détriment des macrophages pro-inflammatoires ce qui mène au développement de la fibrose (Tosello-Tramont et al., 2017, 2016). Enfin, il a également été montré que la déplétion des cellules NK chez des souris *Nfil3-KO* ayant développé une MASH-fibrosante après 8 semaines de MCDD, favorisait une augmentation significative de l'infiltration de macrophages ayant un phénotype pro-fibrosant ainsi qu'une augmentation des dépôts de collagène. Ainsi, les cellules NK intrahépatiques qui seraient recrutées par l'axe CXCL10-CXCR3 semblent avoir un rôle protecteur contre la progression de la fibrose dans la MASH (Fan et al., 2020). L'ensemble de

ces résultats permettent donc de mieux comprendre le rôle protecteur des cellules NK et des ILC1 au cours du développement de la MASH-fibrosante.

v. Cellules NK et ILC1 dans le CHC

Le rôle des différentes populations d'ILC dans le cancer, y compris le CHC, reste également controversé puisque de nombreuses études ont donné des résultats contradictoires (Jacquelot et al., 2022). Cependant, les résultats les plus cohérents qui existent à ce jour concernent les cellules NK, qui représentent une arme contre les tumeurs puisqu'elles ont une capacité unique à détecter et éliminer les cellules malignes (Chiossone et al., 2018; Vivier et al., 2008). Il a notamment été démontré que le nombre de cellules NK CD56 infiltrant le foie chez les patients atteints de CHC était positivement corrélé à la survie et à l'élimination des cellules cancéreuses, confirmant ainsi que l'activité des cellules NK protège contre le cancer (Cai et al., 2008). Cependant, une diminution de la production d'IFN γ , une régulation à la hausse de l'expression des récepteurs NK (NKG2A, TIM3 et CD96) ainsi qu'une régulation négative des récepteurs activateurs (NKp46, NKG2D, TIGIT, CD160, NKp30) ont été rapportées chez ces patients atteints de CHC (Cai et al., 2008). Par ailleurs, chez des patients ayant un CHC avancé, les cellules NK exprimant NKp30 présentent une expression réduite des variantes d'épissage immunostimulantes de NKp30 (NKp30a et NKp30b) et une expression accrue de la variante inhibitrice NKp30c (Mantovani et al., 2019). Ces résultats complémentaires, fournis par deux études bien distinctes, mettent en évidence une dérégulation des cellules NK ayant infiltré les tumeurs dans le CHC, et ainsi une capacité réduite à éliminer les cellules cancéreuses. Plusieurs pistes ont été abordées afin d'expliquer la réduction de l'activité des cellules NK, notamment une possible intervention de monocytes/macrophages dérivés de tumeurs qui stimulent l'axe inhibiteur CD48/2B4 (Wu et al., 2013), ou par l'intervention de cellules suppressives dérivées de myéloïdes capables de réduire la voie de signalisation activatrice du récepteur NKp30 (Hoechst et al., 2009). Par ailleurs, une inhibition des fonctions des cellules NK a également été observée après une co-culture entre des fibroblastes associés au CHC (provenant de tissus tumoraux) et des cellules NK. Ce défaut des fonctions des cellules NK serait dû à PGE2 (prostaglandine E2 rénale) et IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase), tous deux dérivés des fibroblastes activés (Li et al., 2012). Enfin, Zhang *et al.* ont découvert une infiltration des cellules NK CD11bCD27 doublement négatives (DN) dans le tissu tumoral de patients atteints de CHC lié à une infection au VHB. Cette population présente un phénotype immature et une

capacité cytotoxique et cytokinique altérée. Ces cellules NK DN infiltrantes pourraient également expliquer le dysfonctionnement des cellules NK et la progression tumorale. Jusqu'ici, toutes les études que je viens de vous présenter concernant l'implication des cellules NK dans le CHC, ont été menées uniquement chez l'Homme. En effet, peu d'études précliniques existent et cela peut s'expliquer par la difficulté de générer des modèles murins de MASLD induite par l'alimentation atteignant des stades aussi poussés que le CHC. Actuellement, les modèles murins de CHC sont le plus souvent des modèles tumoraux transplantés où des cellules de lignées cellulaires cancéreuses humaines sont injectées par voie sous-cutanée à des souris. Par exemple, l'utilisation de la ligne cellulaire Hep3b, représentative de la nature invasive et oncogénique du CHC, a été utilisée pour étudier le rôle des cellules NK. De manière intéressante, les cellules NK infiltrant les tumeurs présentaient un phénotype non fonctionnel associé à une forte expression du facteur de transcription NR4A1, un régulateur de l'immunité antitumorale (Yu et al., 2023). Les résultats proposés à travers ce modèle semblent cohérents avec les données humaines qui existent à ce jour où les cellules NK dysfonctionnelles dans le CHC sont censées favoriser la progression tumorale.

Le rôle des ILC1 au cours du CHC est à ce jour encore très peu documenté. Cependant, il est clair que le microenvironnement tumoral pourrait jouer un rôle important dans l'orientation du phénotype des ILC1, conduisant ainsi ces cellules à avoir différents destins. L'intervention notamment du TGF β , libéré dans le microenvironnement tumoral, favorise la conversion des cellules NK en cellules ILC1 (ILC1-like) dans des cas de cancers comme le fibrosarcome, le carcinome du côlon ou le carcinome du poumon (Ducimetière et al., 2021; Gao et al., 2017). De plus, des concentrations élevées de TGF β ont été signalées dans le surnageant dérivé de CHC humain (Dituri et al., 2019). La conversion des cellules NK en ILC1-like pourrait donc se produire dans le CHC et pourrait expliquer la diminution du nombre de cellules NK discutées ci-dessus. Par ailleurs, Heinrich *et al.* ont montré que le profil de cytokines dans le microenvironnement tumoral façonne les ILC chez les patients atteints de CHC. Lors de l'analyse du séquençage de l'ARN unicellulaire par cytométrie en flux sur des biopsies de patients atteints de CHC, la présence de cellules de type NK dans le tissu non tumoral a été observée. Au travers de leurs études, ils ont notamment mis en évidence que ces cellules perdent leur capacité cytotoxique au fur et à mesure qu'elles évoluent vers un phénotype ILC1-like (Heinrich et al., 2022). Sur le long terme, la perspective de regarder si le CHC est infiltré par ce sous-ensemble ILC1-like serait fortement intéressant. Prises ensemble, ces études suggèrent que la capacité réduite des cellules NK à éliminer les cellules cancéreuses ou leur fréquence

réduite par une possible conversion en cellules de type ILC1, pourraient conduire au développement du CHC.

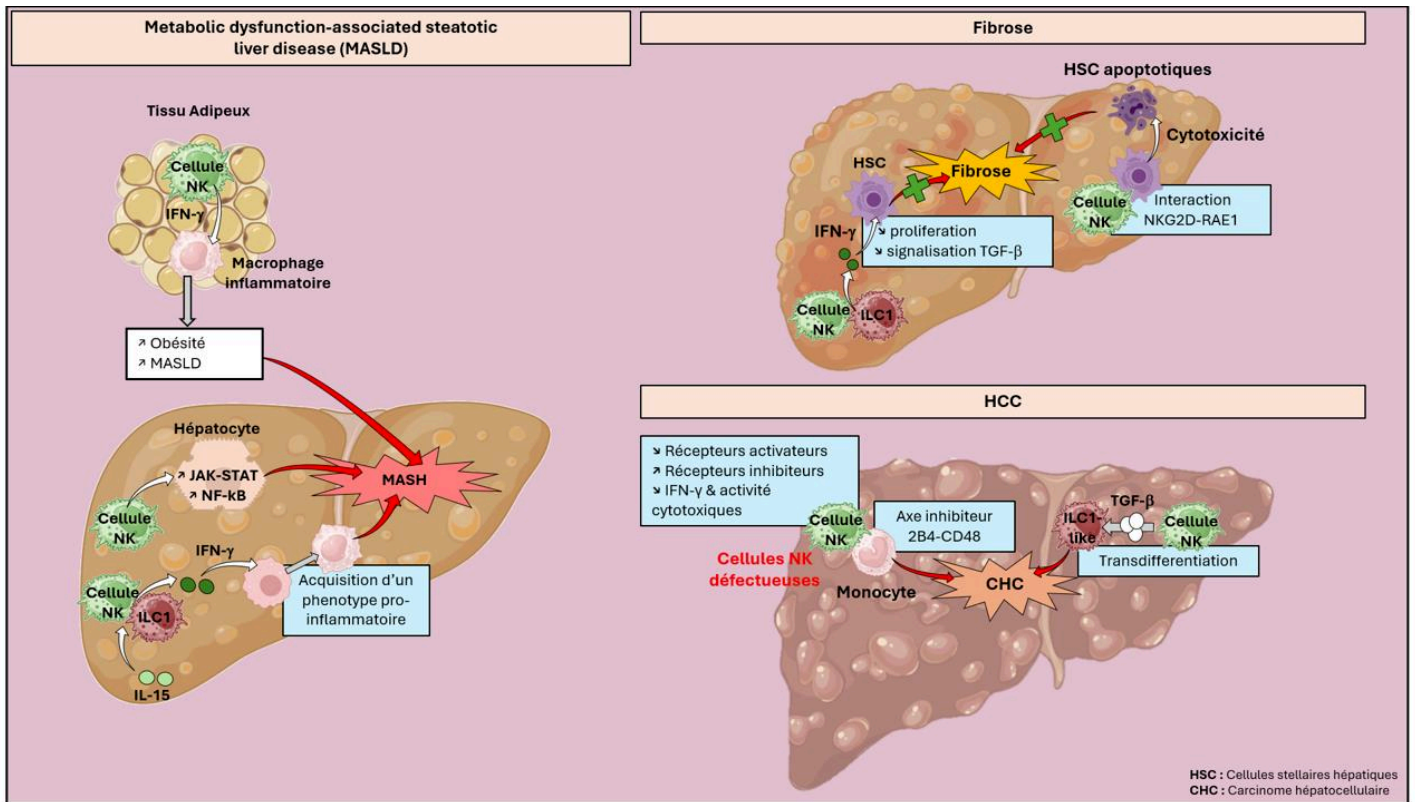


Figure 17. Rôles des cellules NK et des ILC1 au cours de la MASLD.

(Adaptée de Bourinet et al., 2024)

HYPOTHESES ET OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

La maladie hépatique stéatotique associée à un dysfonctionnement métabolique (MASLD) est l'une des principales causes des maladies chroniques du foie dans le monde. Sa prévalence qui augmente parallèlement à celle de l'obésité, est estimée de nos jours à un peu plus de 32%, ce qui fait de cette pathologie un problème majeur de santé public. En l'absence de mesures interventionnistes, la prévalence de la MASLD devrait continuer d'augmenter considérablement dans plusieurs régions du monde d'ici 2030. La stéatohépatite associée au métabolisme (MASH) est la forme évolutive de la MASLD et se caractérise par une importante inflammation hépatique médiée par de nombreux acteurs intrahépatiques dont les cellules immunitaires. Plusieurs acteurs extrahépatiques se sont également révélés être impliqués dans la mise en place de cet état inflammatoire au niveau du foie, comme le tissu adipeux et l'intestin. L'inflammation chronique qui s'installe au cours de la MASH conduit à terme au développement de complications hépatiques plus sévères telles que la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (CHC). Bien que le monde de la recherche redouble d'efforts afin de trouver de nouvelles approches thérapeutiques, il n'existe pour le moment peu ou pas de traitements pharmacologiques efficaces, ni de biomarqueurs pour traiter ou prévenir le développement de la MASLD vers ses formes graves. C'est pourquoi, le fait de disséquer et comprendre le rôle de chacun des acteurs impliqués dans la MASH représente une importance capitale afin de se donner les moyens de trouver un jour une approche thérapeutique efficace. De nombreuses études se sont intéressées aux rôles des différentes sous-populations de cellules innées lymphoïdes (ILC) au cours des maladies métaboliques dont la MASLD. Les ILC3, majoritairement représentées dans l'intestin, sont capables de sécréter d'importantes quantités d'IL-22 qui possède un rôle protecteur dans le foie en régulant le métabolisme lipidique, en diminuant l'inflammation et la souffrance hépatocytaire. Les fonctions des ILC2 du tissu adipeux (TA), sont altérées au cours de l'obésité entraînant une perte de leur capacité de « browning » du TA, menant par conséquent à une aggravation et à la progression de la pathologie. Cependant, la majorité des études s'intéressent plus particulièrement au rôle des cellules NK et des ILC1 au cours de la MASH dû à leur présence relativement plus importante dans les tissus d'intérêt (foie, tissu adipeux, intestin) et leur capacité à produire des médiateurs de l'inflammation comme l'IFN γ et le TNF α . Les données actuelles montrent que les cellules NK et les ILC1 du tissu adipeux (TA) agissent comme des potentialisateurs de l'inflammation du TA au cours de l'obésité. En effet, ces cellules sécrètent de l'IFN γ qui va permettre aux

macrophages d'acquérir un phénotype pro-inflammatoire. Ces mêmes observations ont également été faites au niveau du foie, en partie en réponse à des cytokines telles que l'IL-15 capables d'activer les cellules NK et les ILC1. Il a également été montré que la réponse pro-inflammatoire des cellules NK activées au cours de la MASH conduit à l'activation des voies de signalisation JAK-STAT et NF- κ B dans les hépatocytes, ce qui déclenche la production de ROS et finalement l'apoptose des hépatocytes. L'ensemble de ces résultats mettent donc en lumière de manière évidente l'implication des cellules NK et des ILC1 dans la MASH.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au ciblage de ces cellules au cours de la MASLD et plus particulièrement dans la MASH. Nous avons porté notre attention sur la glycoprotéine de surface CD44 principalement connue pour ses rôles dans les interactions entre cellules, l'adhésion et la migration cellulaire. Par ailleurs, CD44 est exprimée à la surface d'un grand nombre de cellules immunitaires y compris les cellules NK et les ILC1. Enfin, notre équipe a mis en évidence un rôle clé de CD44 dans la progression de la MASH, notamment en favorisant le recrutement de monocytes et de neutrophiles, et en permettant aux macrophages d'acquérir un phénotype pro-inflammatoire. Dans la continuité de cette étude, nous nous sommes posés la question suivante :

« Quelle est la contribution de CD44 dans le rôle qu'exerce les cellules NK et les ILC1 au cours de la MASLD/MASH ? »

Afin de pouvoir répondre à cette question, nous avons généré un modèle d'inactivation spécifique de CD44 au sein des cellules exprimant le récepteur activateur Nkp46, en se basant sur le système Cre/Lox. Ce modèle nous a donc permis d'inactiver CD44 au sein des cellules NK, des ILC1, mais également au sein d'une sous-population d'ILC3 exprimant Nkp46 (ILC3 Nkp46⁺). Etant donné que les ILC3 sont très faiblement représentées au niveau hépatique, les résultats de notre étude reflèteront en particulier l'effet de l'inactivation spécifique de CD44 sur les cellules NK et les ILC1. Les études menées sur l'intestin prendront cependant en compte la sous-population d'ILC3 Nkp46⁺.

Dans ce contexte, les objectifs de mon travail de thèse se sont donc articulés autour de 3 axes :

1. Identifier l'impact de l'inactivation spécifique de CD44 au sein des ILC NKp46⁺ sur la physiopathologie de la MASLD au niveau hépatique et intestinal, mais également sur la dynamique des cellules NK et des ILC1, dans des modèles murins de stéatohépatite.
2. Caractériser et comprendre plus précisément l'impact de l'inactivation spécifique de CD44 sur les fonctions des ILC NKp46⁺.
3. Etudier le rôle du métabolisme au sein des ILC NKp46⁺ invalidées pour CD44.

RESULTATS PARTIE I

Résumé article

CD44 in group 1 innate lymphoid cells impacts the development and progression of metabolic steatohepatitis by regulating liver and gut inflammation.

Le nombre d'ILC NKp46⁺ du foie corrèle avec les anomalies hépatiques au cours de la stéatohépatite induite par l'alimentation (Figure 1).

Afin d'étudier la dynamique des ILC NKp46⁺ au cours de la MASLD nous avons nourri des souris WT pendant 2, 4 et 7 semaines avec un régime déficient en choline et en méthionine (MCDD). Comme nous l'attendions, les souris nourries avec le régime MCDD ont bien développé au cours du temps toutes les caractéristiques hépatiques associées à la MASLD : stéatose, foyers inflammatoires, souffrance hépatocytaire, ainsi qu'une fibrose. Par ailleurs, l'expression du gène *Ncr1*, qui code pour la protéine NKp46 et qui est augmentée au cours du régime, est positivement corrélée aux paramètres hépatiques : ALT, stéatose, foci inflammatoires. Les analyses menées par cytométrie en flux, ont mis en évidence une augmentation du nombre d'ILC NKp46⁺ qui est notamment associée à l'augmentation du nombre de cellules NK au niveau du foie (CD49b⁺ CD49a⁻), et toutes deux sont corrélés aux mêmes paramètres que précédemment : ALT, stéatose, foci inflammatoire. Dans l'ensemble, ces données indiquent l'existence d'une corrélation positive des ILC NKp46⁺ et des cellules NK avec la progression de la MASLD chez la souris.

L'invalidation spécifique de CD44 dans les ILC NKp46⁺ affecte négativement le nombre de cellules NK CD49b⁺ et d'ILC1 CD49a⁺ au cours du développement de la stéatohépatite (Figure 2).

L'expression hépatique de *Cd44* est augmentée chez les souris WT nourries avec le régime MCDD et les ILC1 hépatiques expriment des niveaux plus élevés de CD44 que les cellules NK. Afin d'étudier plus précisément le rôle de CD44 par rapport aux ILC NKp46⁺ dans la MASH, les souris invalidées pour CD44 dans les ILC NKp46⁺ (souris *Ncr1^{iCre/+}CD44^{fllox/fllox}*) ont été nourries pendant 4 semaines avec le régime MCDD. Ces souris *Ncr1^{iCre/+}CD44^{fllox/fllox}* présentent une diminution du niveau d'expression du gène *Ncr1* et parmi les ILC NKp46⁺ nous avons constaté une réduction significative du nombre absolu de cellules NK CD49b⁺ et d'ILC1

CD49a⁺. Ces données indiquent que la déficience de CD44 dans les ILC NKp46⁺ affecte négativement leur nombre relatif dans le foie de souris ayant développé une MASH.

L'invalidation de CD44 dans les ILC NKp46⁺ aggrave les complications hépatiques associées à la MASH (Figure 3).

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'absence de *Cd44* dans les ILC NKp46⁺ pouvait influencer le développement de la stéatohépatite. Les analyses menées par cytométrie en flux ont mis en évidence une augmentation de la fréquence et du nombre de macrophages pro-inflammatoires hépatiques (F4/80⁺ CD11b^{high} CD11c⁺) chez les souris *Ncr1^{iCre/+}CD44^{flox/flox}* sous MCDD. L'expression génique des marqueurs myéloïdes *Itgam* (codant pour CD11b) et *Itgax* (codant pour CD11c) est également augmentée. Les souris *Ncr1^{iCre/+}CD44^{flox/flox}* présentent aussi une inflammation hépatique plus importante, évaluée par l'expression de marqueurs inflammatoires tels que *Tnfα*, *Cd44* et *Ccl2*, qui sont associés au recrutement et à l'activation des macrophages dans la MASH. Cette aggravation de l'inflammation hépatique est également accompagnée d'une augmentation des niveaux d'ALT, de l'expression des marqueurs pro-fibrogéniques (*Colla1*, *Timp1*, *Tgfb* et *Spp1*) et de dépôts de collagène.

L'invalidation de CD44 dans les ILC NKp46⁺ affecte leur nombre et aggrave les complications hépatiques dans le cadre de la MASH induite par un régime occidental (Western Diet) (Figure 4).

Etant donné que le MCDD ne reproduit pas entièrement les dysfonctionnements métaboliques de la pathologie, nous avons jugé utile de confirmer nos résultats avec un régime obésogène induisant une MASH (Western Diet 24 semaines). Les résultats que nous avons obtenu pour nos souris *Ncr1^{iCre/+}CD44^{flox/flox}* soutiennent et reproduisent quasiment en tous points ceux que nous avons observés avec le régime MCDD, à l'exception de l'augmentation du nombre de macrophages pro-inflammatoires.

Les marqueurs hépatiques des cellules NK sont associés avec les caractéristiques de la MASLD chez des patients atteints d'obésité (Figure 5).

L'expression hépatique d'*Eomesodermine*, qui contribue à définir en partie les cellules NK hépatiques chez l'Homme, est régulée à la hausse chez les patients atteints de MASLD et est

corrélée à la stéatose hépatique, à l'expression de *Cd44* et à l'expression du marqueur macrophagique *Cd68*. Ces résultats pourraient indiquer que les cellules NK peuvent contribuer au développement des complications hépatiques chez les patients souffrant d'obésité.

La déficience de CD44 dans les ILC NKp46⁺ de l'intestin affecte leur nombre et modifie les fonctions intestinales au cours de la stéatohépatite (Figure 6).

Les ILC NKp46⁺ de l'intestin (cellules NK, ILC1, ILC3^{NKp46+ROR γ T+}) de souris WT expriment toutes CD44 à l'état basal. Après invalidation spécifique de CD44 dans les ILC NKp46⁺, les souris *Ncr1^{iCre/+}CD44^{flox/flox}* nourries avec le MCDD présentent un nombre plus faible d'ILC NKp46⁺, associé à une diminution du nombre de cellules NK et d'ILC1 mais pas d'ILC3^{NKp46+ROR γ T+}. La déficience de CD44 dans les ILC NKp46⁺ influence également le nombre de cellules NK et d'ILC1 intestinales au cours de la MASH. Par ailleurs, les souris *Ncr1^{iCre/+}CD44^{flox/flox}* présentent également une augmentation de la perméabilité intestinale, une altération de la structure de l'iléon et une augmentation du nombre d'IgG dirigés contre le LPS dans la circulation sanguine. L'ensemble de nos données suggèrent que la modification des fonctions intestinales est associée à l'aggravation des lésions hépatiques observées chez les souris *Ncr1^{iCre/+}CD44^{flox/flox}*.

Le phénotype inflammatoire des cellules NK déficientes pour CD44 et stimulées au LPS favorise la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires par les hépatocytes (Figures 7 et 8).

Il est bien connu que les PAMPs, y compris le LPS, sont les principaux régulateurs de l'activation des cellules immunitaires hépatiques et du maintien de l'inflammation du foie. Nous avons donc stimulé les cellules NK hépatiques de souris contrôles et de souris *Ncr1^{iCre/+}CD44^{flox/flox}* au LPS *in vitro* afin d'étudier leur fonction. Les souris *Ncr1^{iCre/+}CD44^{flox/flox}* présentent après 5h de stimulation au LPS une augmentation de leur capacité glycolytique, ainsi qu'une augmentation de l'expression et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par rapport aux souris contrôles. Pour valider le fait que les cellules NK contribuent à l'inflammation locale et aux lésions hépatiques au cours de la MASH, nous avons ensuite étudié l'effet direct des cytokines dérivées des cellules NK traitées au LPS sur les hépatocytes *in vitro*. Les hépatocytes primaires isolés de souris saines et traitées avec le surnageant de cellules NK-CD44^{KO+LPS} présentent une augmentation de l'expression et de la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires et une augmentation de l'expression de marqueurs

du stress oxydatif. Ces résultats suggèrent que l'activation des cellules NK par le LPS en l'absence de CD44 pourrait induire directement un stress oxydatif hépatocytaire et une augmentation de l'inflammation qui pourraient soutenir l'inflammation chronique au cours de la stéatohépatite.

Conclusion

Ces résultats suggèrent que CD44 est un régulateur d'une partie des fonctions des cellules NK hépatiques et son absence au sein de ces cellules favorise le développement et la progression de la maladie. Notre étude permet donc de mieux comprendre la physiopathologie de la MASLD et suggère que le ciblage des fonctions des cellules NK représente un axe d'étude pour le développement d'approches thérapeutiques pour prévenir/traiter les complications hépatiques associées à l'obésité.

CD44 in group 1 innate lymphoid cells impacts the development and progression of metabolic steatohepatitis by regulating liver and the gut inflammation

Manon Bourinet¹, Elodie Vieira¹, Déborah Rousseau¹, Stéphanie Bonnafous², Frédéric Soysouvanh¹, Axelle Strazzulla¹, Coline Elliot¹, Stéphanie Patouraux², Pierre S Leclère^{1,5}, Irina Moskalevska³, Julien Cherfils-Vicini³, Meri K Tulic¹, Béatrice Bailly-Maitre¹, Véronique Orian-Rousseau⁴, Antonio Iannelli², Albert Tran², Rodolphe Anty², Philippe Gual^{1*} and Carmelo Luci^{1*}

¹ Université Côte d'Azur, INSERM, U1065, C3M, Nice, France; ² Université Côte d'Azur, CHU, INSERM, U1065, C3M, Nice, France; ³ Université Côte d'Azur, IRCAN, CNRS 7284, Inserm U1081, IHU RESPIRera; ⁴ Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Institute of Biological and Chemical Systems – Functional Molecular Systems (IBCS-FMS), Karlsruhe, Germany; ⁵ Present address : Department of Microbiology, Infectious Diseases and Immunology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany

* corresponding author: Dr. Carmelo LUCI, carmelo.luci@inserm.fr and Dr. Philippe GUAL, philippe.gual@inserm.fr

KEYWORDS: NK cells, ILC1s, steatohepatitis, Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, inflammation.

Abstract word count: 268

Figures: 8 and 5 supplementary

Table: 1

DISCLOSURES: The authors declared no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS: M.B. and E.V. performed the research and analysis and helped in editing the manuscript. D.R., S.B., performed the research and analysis. P.S.L., A.S., F.S., C.E., J.C.V., I.M., assisted with the experiments. S.P., A.I., R.A., A.T. contributed to human sample and data collection and provided intellectual insights. V.O.R. provided material support for the research and insights. M.K.T. assisted with gut permeability experiments and helped in editing of the manuscript. B.B.M. provided insights. P.G. designed the research and wrote the manuscript. C.L. designed, supervised, performed, analyzed the research, wrote and edited the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FINANCIAL SUPPORTS : This work was supported by grants from Institut National de la santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université Côte d'Azur and various charities (Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF) to PG and CL). This work was also funded by the French Government (National Research Agency, ANR): #ANR-18-CE14-0019-02, #ANR-19-CE14-0044-01, #ANR-21-CE14-0015-03, #ANR-22-CE14-0027-01, #ANR-23-CE14-0048-03 and through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE (#ANR-11-LABX-0028-01) and the UCA^{JEDI} Investments in the Future project (#ANR-15-IDEX-0001) and German Government (Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG OR124/21-1). EV was supported by a PhD grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and MB by the ANR (#ANR-18-CE14-0019-02). MB is currently supported by a doctoral fellowship from the French Ministry of Research and from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

HIGHLIGHTS:

- Liver group 1 innate lymphoid cells which encompass, Natural Killer Cells (NK cells) and type 1 innate lymphoid cells (ILC1s) positively correlated with hepatic injury and inflammation during steatohepatitis
- CD44, a cellular protein regulates the dynamic of liver and gut NK cells and ILC1s
- CD44 deficiency in NK cells and ILC1s aggravates liver abnormalities in mouse models of steatohepatitis and metabolic dysfunction-associated steatotic liver diseases (MASLD)
- Gut dysfunctions are increased in mice deficient for CD44 in NK cells and ILC1s
- LPS predisposes CD44-deficient NK cells to a more proinflammatory phenotype which in turn triggers the release of inflammatory mediators by hepatocytes

IMPACTS AND IMPLICATIONS:

Liver inflammation is a key event in the development and progression of metabolic dysfunction-associated steatotic liver diseases (MASLD). Our work highlights the contribution of Natural Killer Cells (NK cells) and type 1 innate lymphoid cells (ILC1s) in steatohepatitis and MASLD. Further, our results indicate that the cellular protein CD44 regulate their dynamic and their functions and its specific deletion in NK cells and ILC1s aggravates liver abnormalities and gut functions. Our research helps to understand the tight regulation of inflammation during chronic liver diseases and provides new reliable potential biomarkers and therapeutic targets for MASLD.

ABSTRACT

Background and Aims:

Innate Lymphoid Cells (ILCs) shape immune responses and play pivotal roles in inflammation and fibrosis which are key features of chronic liver diseases. The contribution of group 1 ILCs, including natural killer (NK) cells and helper-like ILC1s, to Metabolic dysfunction-associated steatotic liver diseases (MASLD) is still matter of debate and require further investigation.

Methods:

The targeting of the cell surface molecule cluster of differentiation (CD) 44 was used to investigate how group 1 ILCs could affect the development of MASLD. To answer this question, we engineered a mouse model of specific deficiency of CD44 in group 1 ILCs and challenged mice with models of diet-induced steatohepatitis and MASLD. We also evaluate expression of NK cell marker in liver of patients with obesity developing MASLD.

Results:

Here, we found that CD44 deficiency in group 1 ILCs aggravated hepatic complications. Inflammatory macrophages accumulated in the liver leading to the exacerbation of hepatic injury, inflammation and fibrosis priming. Further, hepatic expression of group 1 ILC marker Eomesodermin, CD44 and macrophage marker CD68 are increased in liver of patients with obesity. Moreover, specific deletion of CD44 and group 1 ILCs also prevents their intestinal accumulation and induces a robust loss of ileum integrity leading to increased endotoxemia as evaluated by circulating lipopolysaccharide (LPS) antibodies. Finally, LPS-stimulated CD44-deficient NK cells are more prone to an inflammatory phenotype which in turn triggers the release of pro-inflammatory mediators by hepatocytes.

Conclusions:

Our findings reveal a novel role for CD44 in regulating the dynamic of group 1 ILCs which in turn affects MASLD development and may represent a reliable biomarker/therapeutic target for MASLD.

INTRODUCTION

Non Alcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD) or Metabolic dysfunction-associated steatotic liver diseases (MASLD) are the leading causes of chronic liver diseases and its prevalence is growing worldwide [1]. These hepatic abnormalities range from the benign simple hepatic steatosis characterized by accumulation of lipids in hepatocytes to metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH). MASH is characterized by a persistent inflammatory state, increased liver injury and a predisposition to more severe liver abnormalities such as fibrosis/cirrhosis and hepatocellular carcinoma [2]. Gut dysfunction contributes to disease progression from normal liver to fatty liver and MASH [3, 4]. Indeed, intestinal dysbiosis and alteration of the gut barrier are key events that lead to increased intestinal permeability in MASLD [5, 6]. The leaky gut then releases bacterial-derived products that reach the liver via the portal vein and activate local immune cells and hepatocytes after binding to pattern recognition receptors (PRRs) [2, 7]. The exact mechanism regulating the modification of the intestinal barrier in metabolic disorders is not yet completely understood and is under investigation.

Innate Lymphoid Cells (ILCs) are part of innate immunity and are well equipped to quickly respond to local injury and shape immune responses, as well as maintain epithelial integrity and tissue repair [8]. ILC subsets are defined as the innate counterparts of T lymphocytes and consist of a family of cells divided into 5 subsets, namely, Natural Killer (NK) cells, ILC1s, ILC2s, ILC3s and Lymphoid Tissue-Inducer cells (LTi) [9]. Most of them are cytokine producers and tissue-resident cells with exception of circulating cytotoxic NK cells [10]. Accumulating evidence indicated that cellular metabolism (glycolysis, oxidative respiration, fatty acid oxidation) is required for the activation of NK cells [11]. During the course of an immune response, NK cells undergo metabolic reprogramming that supports their functions, and this is greatly influenced by the environment as recently demonstrated during diseases such as cancer, infection or obesity [12,13]. NK cells and ILC1s share expression of several markers, such as the activating receptor NKp46 which also define a subset of intestinal ILC3s [14-16]. These cells play important roles in host protection against pathogens and tumors and were recently implicated in the pathogenesis of metabolic disorders, mainly by regulating local macrophage functions [17]. In adipose tissue, NK cells/ILC1s were shown to foster inflammation and in turn to degrade metabolic parameters (insulin resistance, glycemia) in obesity [18-21]. In the liver, the contribution of NKp46⁺ cells to the onset and progression of hepatic abnormalities in diet-induced MASLD is a matter of debate, presumably due to their phenotypical and functional heterogeneity [22-25]. In order to propose new therapeutic targets against MASH, we

previously identified cluster of differentiation 44 (CD44) as a key player in regulating hepatic inflammation. Indeed, in a mouse model of diet-induced MASH, targeting CD44 (deficiency or antibody neutralization) partially prevents or corrects MASH, by reducing macrophage activation and/or their recruitment [26]. However, these global approaches do not decipher the relative contribution of different CD44⁺ liver cells including the ILCs to the development and progression of MASLD. CD44 is a cell-surface glycoprotein involved in cell–cell interactions, cell adhesion, migration, activation and is mainly expressed on immune cells [27]. CD44 also contributes to leukocyte recruitment to inflammatory sites and its targeting can limit the inflammatory response [28]. The role of CD44 in the physiology of T lymphocytes and macrophages is becoming better understood [29][30-32]. However, little is known about its contribution to ILC behavior under physiological and pathological conditions.

Here we investigated the dynamic of NKp46⁺ ILCs from mouse liver and gut in two models of steatohepatitis and MASH as well as expression of NK cell marker in liver biopsies from MASLD patients. Given that CD44 is crucial for the regulation of hepatic inflammation, we hypothesized that CD44 could influence NKp46⁺ ILC behavior and in turn, MASLD development. To address this issue, we generated a mouse model of NKp46-specific *Cd44* deletion (*Ncr1*^{iCre/+} *Cd44*^{flox/flox}) and found that hepatic and gut NKp46⁺ ILC numbers are affected compared to littermate mice. *Ncr1*^{iCre/+} *Cd44*^{flox/flox} mice displayed an increased number of pro-inflammatory liver macrophages, aggravation of liver injury and enhanced priming of hepatic fibrosis after challenge with diet-induced steatohepatitis and MASH. We suggest that the appearance of these liver abnormalities could be explained by modification of the intestinal barrier and increased gut permeability. Moreover, LPS treatment of NK cells enhances their inflammatory status when CD44 is deleted and establishes an inflammatory loop with hepatocytes. Finally, we showed that in MASLD patients, hepatic expression of NK cell markers positively correlates with *Cd44* and with the macrophage marker *CD68*. Our data indicated that CD44 on NKp46⁺ ILCs may regulate their functions and responses involved in the dialogue between liver cells (hepatocytes and macrophages) and in intestinal homeostasis during MASLD development.

METHODS

Animals and study design

C57BL/6J/Rj wild-type, *Ncr1*^{iCre/+} *CD44*^{flox/flox} and littermate control *Ncr1*^{+/+} *CD44*^{flox/flox} mice were acclimated under a 12/12h light/dark cycle at a temperature of 21 ± 2 °C . They were fed *ad libitum* either a methionine and choline-deficient diet (MCDD) or control-diet (CD) for 2,4 or 7 weeks (diets from Ssniff: #E15653-94 EF MCD | without Methionine/Choline, #E15654-04 EF CONTROL Methionine/Choline). Littermate mice and *CD44*^{flox/flox}*Ncr1*^{Cre/+} male mice were also fed *ad libitum* either a Western Diet (diet from Ssniff #S8926-E060 EF Western diet, +0.5 % Cholesterol, custom-made) or chow diet (CD) and the drinking water was supplemented with 15% fructose for 24 weeks. *Ncr1*^{iCre} mice were provided by Pr. E.Vivier (CIML, Marseille, France) [33] and *CD44*^{flox/flox} mice were previously described [34]. The sequence encoding 'codon-improved' iCre recombinase is inserted into the 3' untranslated region of *Ncr1* (which encodes NKp46). *Ncr1*^{iCre} mice were bred with *CD44*^{flox/flox} to generate NKp46^{iCre/+} *CD44*^{flox/flox} and NKp46^{+/+}*CD44*^{flox/flox} littermates. C57BL/6JRj wild-type were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). All mice were bred in our pathogen-free animal facility. The local ethics committee (CIEPAL n°28, Nice Côte d'Azur, France) approved the animal experiments.

Human studies

Morbidly patients with obesity (Nice) (n=20) were recruited through the Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation (Archet 2 University Hospital, Nice, France) where they underwent bariatric surgery for their morbid obesity. Bariatric surgery was indicated for these patients in accordance with French guidelines. Exclusion criteria were: presence of hepatitis B or hepatitis C infection, excessive alcohol consumption (>20g/d) or another cause of chronic liver disease. The characteristics of the study groups are described in Table 1. Before surgery, fasting blood samples were obtained and used to measure alanine and aspartate transaminases, glucose, insulin and HbA1c. Insulin resistance was calculated using the homeostatic model assessment index (HOMA-IR) [35]. Surgical liver biopsies were obtained during surgery and no ischemic preconditioning was performed. Hepatic histopathological analysis was performed according to the scoring system of Kleiner et al. [36]. Three histopathological features were semi-quantitatively evaluated: grade of steatosis (0, <5%; 1, 5%-30%; 2, >30%-60%; 3, >60%), lobular inflammation (0, no inflammatory foci; 1, <2 inflammatory foci per 200x field; 2, 2-4 inflammatory foci per 200x field; 3, >4 inflammatory foci per 200x field) and hepatocellular ballooning (0, none; 1, few balloon cells; 2, many

cells/prominent ballooning). MASLD activity score (NAS), which is the unweighted sum of scores of steatosis, lobular inflammation, and hepatocellular ballooning, was used to grade activity. Presence of MASH was defined as $NAS \geq 5$. Control subjects: liver tissue was obtained from 5 lean subjects (5 women; age, 44 ± 9 years; BMI, 21 ± 1.9 kg/m²) undergoing partial hepatectomy for benign tumors (neighbor tissues from four adenoma and one focal nodular hyperplasia; CHU Henri Mondor, Department of Pathology, AP-HP - Université Paris Est Créteil, Créteil, France). Three subjects underwent a left lobectomy or a bisegmentectomy without ischemic preconditioning and two patients underwent a right hepatectomy with a potential ischemic preconditioning (no data). Liver samples did not display any hepatic steatosis, inflammation or fibrosis. All subjects gave their informed written consent to participate in this study, in accordance with French legislation regarding Ethics and Human Research (Huriet-Serusclet law). The “Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Nice” approved the study (07/04:2003, N° 03.017).

Statistical analysis

Statistical significance was assessed with Prism software version 7.0 (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA). Depending on the data distribution, we used a one-way ANOVA Kruskal–Wallis test or a Mann–Whitney test, and pairwise multiple comparisons of experimental groups were performed using two-way ANOVA Tukey test. Correlations were analyzed using the Spearman’s correlation test. For all tests, $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Liver NKp46⁺ ILC numbers correlated with hepatic abnormalities during diet-induced steatohepatitis

We first investigate the dynamics of NKp46⁺ ILCs in the livers of mice fed with methionine- and choline-deficient diet (MCDD) for 2, 4 and 7 weeks. Such a regime time course allows hepatocyte damage and hepatic abnormalities to appear gradually, extending from isolated steatosis (at 2 weeks) to steatohepatitis (at 4 weeks) and finally to fibrosis (at 7 weeks). Histological analyses confirmed the presence of fat accumulation in lipid droplets (steatosis) and inflammatory foci in livers of mice fed for 2, 4 and 7 weeks with MCDD compared to the control diet (CD) (**Figures 1A and S1A**). Fibrosis was also confirmed with collagen deposits at 7 weeks (**Figure 1A**). Mice also displayed evidence of liver injury as shown by increased circulating serum alanine aminotransferase (ALT) activity during disease progression (**Figure 1B**). The hepatic level of the *Ncr1* gene which encodes for the NKp46 protein is strongly

increased at 2, 4 and 7 weeks in MCDD-fed mice (**Figure S1B**). This expression positively and significantly correlated with hepatic steatosis, number of inflammatory foci and transaminase levels (**Figure S1C**). We then monitored changes in the number of NKp46⁺ ILCs among liver CD45⁺ cells by flow cytometry according to disease development. We found a significant increase in NKp46⁺ ILC numbers in MCDD-fed mice and a positive correlation between these absolute numbers and grade of steatosis, number of liver inflammatory foci and transaminase levels (**Figures 1C and 1D**). Liver NKp46⁺ ILCs are comprised of CD49b⁺ CD49a⁻ NK cells and CD49b⁻ CD49a⁺ ILC1s. Upon MCDD challenge, we found a large increase in the NK cell/ILC1s ratio compared to CD (**Figure 1E**). Furthermore, NK cell number positively correlated with hepatic steatosis, number of liver inflammatory foci and ALT levels as MASLD progressed, emphasizing the contribution of liver NK cells to the disease (**Figure 1F**). In addition, the hepatic expression of the transcription factor Eomesodermin which helps to identify CD49b⁺ CD49a⁻ NK cells but not CD49b⁻ CD49a⁺ ILC1s [37,38], was also increased during disease development and positively correlated with *Ncr1* expression (**Figures S1D-F**). Altogether, our data indicate that hepatic NKp46⁺ ILCs and NK cells are correlated with disease progression in mice.

CD44 deficiency in NKp46⁺ ILCs negatively affects liver CD49b⁺ NK cells and CD49a⁺ ILC1s numbers with steatohepatitis development.

Our previous study emphasized a pivotal role of CD44 in regulating the pro-inflammatory liver macrophage pool in steatohepatitis [26]. We therefore investigated whether CD44 could also influence the behavior of NKp46⁺ ILCs in our mouse model. First, hepatic *Cd44* expression was increased in MCDD-fed mice and strongly correlated with *Ncr1* expression (**Figures S2A**). Consistent with previous reports [39,40], hepatic ILC1s expressed higher levels of CD44 in comparison to NK cells (**Figure 2A**). To address more precisely the role of CD44 in NKp46⁺ ILCs physiology, we deleted *Cd44* in NKp46-expressing cells by crossing *Cd44*^{flx/flx} mice with *Ncr1*^{iCre/+} mice. *Ncr1*^{iCre/+}*Cd44*^{flx/flx} mice were obtained at Mendelian frequencies, developed normally and were fertile. As shown in **Figure 2B**, liver NK cells and ILC1s fail to express CD44 at the cell surface in *Ncr1*^{iCre/+}*Cd44*^{flx/flx} mice compared to their littermate counterparts. This deletion is restricted to NKp46⁺ ILCs, since CD44 expression is not affected on ILC2s or on T cells (**Figure S2B**). Furthermore, this deficiency decreased the absolute number of hepatic NKp46⁺ ILCs demonstrating that CD44 influences hepatic proportion of NKp46⁺ ILC at steady state (**Figure 2C**). We next investigated its impact on NKp46⁺ ILC frequency with MASH development. Here, we challenged *Ncr1*^{iCre/+}*Cd44*^{flx/flx} mice with

MCDD-induced steatohepatitis for 4 weeks. As reported above for WT mice (**Figure 1**), littermate *Ncr1^{+/+}Cd44^{flox/flox}* mice had significantly increased hepatic mRNA level expression of *Ncr1* as well as total number of liver NKp46⁺ ILCs after MCDD challenge (**Figures 2D and 2E, respectively**). After 4 weeks of MCDD feeding, *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* mice displayed a significantly lower level of *Ncr1* expression and number of NKp46⁺ ILCs compared to *Ncr1^{+/+}Cd44^{flox/flox}* mice (**Figures 2D and 2E, respectively**). Also, among NKp46⁺ ILCs, we found a significant reduction in the absolute number of NK cells and ILC1s after 4 weeks of MCDD which is not due to altered levels of the proliferative cytokine IL-15 (**Figure 2E and Figure S2C**). As observed in WT mice (**Figure 1E**), CD49b⁺ NK cells numbers were elevated compared to CD49a⁺ ILC1s in livers of *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}*-challenged mice (**Figure S2D**). These data indicate that the deficiency of CD44 within NKp46⁺ ILCs negatively affects their relative numbers in the MASH liver.

CD44 deficiency in NKp46⁺ ILCs aggravated liver abnormalities in steatohepatitis

We next investigated whether the absence of *Cd44* in NKp46⁺ ILCs could influence the development of steatohepatitis. Histological analyses did not reveal any difference in hepatic steatosis and accumulation of inflammatory foci in MCDD-fed *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* mice compared to MCDD-fed littermate mice (**Figure S3A**). In line with this, the proportions of hepatic and blood monocytes and neutrophils are indeed increased after exposure to MCDD, but do not change according to the genotype of the mouse (**Figures S3B-D**). In contrast, flow cytometry analyses of cell suspensions revealed that the frequency and number of F4/80⁺ CD11b^{high} CD11c⁺ cells (defining inflammatory macrophages) are significantly increased in the livers of MCDD-challenged mice and this infiltration is more pronounced in *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* mice (**Figure 3A**). This was associated with higher hepatic expression of the myeloid cell markers *Itgam* (encoding for CD11b) and *Itgax* (encoding for CD11c) (**Figure 3B**). In addition, MCDD-fed *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* mice exhibited greater liver inflammation, assessed by the expression of inflammatory markers such as *Tnfa*, *Cd44* and *Ccl2* which have been associated with macrophage recruitment/activation in MASH [26] (**Figure 3B**). This aggravation of liver inflammation has been also associated with higher liver injury as shown by higher serum ALT activity levels (**Figure 3C**). We also observed enhanced hepatic fibrosis as assessed by the expression of pro-fibrogenic markers *Colla1*, *Timp1*, *Tgfb* and *Spp1* (encoding for osteopontin) and collagen deposits [26] (**Figure 3D and 3E**). Collectively, these data underscore the tight regulation of steatohepatitis onset by CD44-expressing NKp46⁺ ILCs.

CD44 deficiency in NKp46⁺ ILCs affects their relative numbers and aggravates liver abnormalities with Western Diet induced-MASH.

Being aware that MCDD challenge does not fully reproduce human metabolic dysfunctions associated with obesity, we found it relevant to confirm our results with obesogenic diet inducing MASH. Mice were then challenged with a Western Diet (WD), enriched in cholesterol, fat and fructose. As expected, we observed an increase in the body weight and the development of fatty livers after 24 weeks of WD but no difference in weight gain in the absence of CD44 on NKp46⁺ ILCs (**Figures S4A and S4B**). Next, we evaluated the NKp46⁺ ILCs distribution in this model. As reported upon MCDD challenge (**Figures 2D and 2E**), the hepatic mRNA level expression of *Ncr1* as well as the total number of liver NKp46⁺ ILCs and NK cells significantly increased in littermate mice fed with Western Diet (**Figures 4A and 4B, respectively**). However, we noted that the number of ILC1s was increased in *Ncr1^{+/+}Cd44^{flox/flox}* mice under Western Diet (**Figure 4B**). Concerning the *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* mice, we interestingly found the same results under Western Diet as those obtained under MCDD including a lower level of *Ncr1* expression and NKp46⁺ ILC number (**Figures 4A and 4B, respectively**), reduced number of ILC1s and NK cells (**Figure 4B**), aggravation of hepatic inflammation (**Figure 4C**), injury (ALT) (**Figure 4D**), fibrosis and collagen deposits (**Figure 4E and 4F**). Overall, the Western Diet model has reinforced the results we previously obtained with the MCD diet and underscore the tight regulation of MASLD onset by CD44-expressing NKp46⁺ ILCs.

Hepatic NK cell markers are associated with MASLD features in obese patients

We then examined the relationship between hepatic expression of NK cell and ILC1 markers with MASLD in liver biopsies from patients with severe obesity who had undergone bariatric surgery. Patients were classified into 2 groups: without MASLD (n=7) and with MASLD (n=13) including 8 patients with hepatic steatosis, and 5 with metabolic steatohepatitis (assessed on the basis of histopathological features; **Table 1**). Hepatic expression of *Eomesodermin* which also helps to define hepatic NK cells in humans is upregulated at the mRNA level in MASLD patient [41] (**Figure 5A**). The upregulation of *Eomesodermin* also correlated with liver steatosis and with the expression of *Cd44* and the macrophage marker *Cd68* (**Figure 5B and 5C respectively**). These findings could indicate that NK cells may also contribute to the development of liver complications in patients with obesity.

CD44 deficiency in NKp46⁺ ILCs affects gut NKp46⁺ ILC numbers in steatohepatitis

A growing body of experimental and clinical data suggests the gut-liver axis plays a primary role in steatohepatitis pathogenesis. We attempted to identify the underlying mechanism that leads to the increase in liver inflammation and injury in MCDD-fed *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* mice. First, we sought to determine the CD44 expression in gut lamina propria NKp46⁺ ILCs which are comprised of NK cells, ILC1s and a subset of ILC3s. Flow cytometry analyses of *lamina propria* cell suspension of naïve WT C57BL/6 mice revealed that gut NK cells, ILC1s and NKp46⁺ RORγt⁺ ILC3s express CD44 as well as gut NKp46⁻ RORγt⁺ ILC3s and GATA3⁺ ILC2s (**Figures 6A and S5A**). Consistent with our finding in the liver, only gut NK cells, ILC1s and NKp46⁺ ILC3s lose their CD44 expression in *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* mice (**Figures 6B and S5B**). Upon MCDD challenge, *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* mice displayed significantly lower numbers of gut NKp46⁺ ILCs, NK cells and ILC1s compared to *Ncr1^{+/+}Cd44^{flox/flox}* mice (**Figures 6C and 6D, respectively**). Notably, the CD49b⁺ NK cell/CD49a⁺ ILC1s ratio and NKp46⁺ ILC3 frequency and number did not vary between genotypes (**Figures S5C and S5D**). Altogether, these data indicated that CD44 deficiency in NKp46⁺ ILCs also influences the enrichment of gut NK cells and ILC1s during steatohepatitis.

CD44 deficiency in NKp46⁺ ILCs modified gut functions in steatohepatitis

Human and animal studies have confirmed that gut dysfunction and increased intestinal permeability drive the pathogenesis of MASLD. To investigate signs of epithelial damage, we analyzed the expression of the tight junction protein zonula occludens-1 (ZO-1) in the ileum of *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* and *Ncr1^{+/+}Cd44^{flox/flox}* mice by immunohistochemistry. As shown in **Figure 6E**, ZO-1 expression is not modified in CD-fed *Ncr1^{iCre}Cd44^{flox/flox}* mice compared to littermate controls. Upon MCDD feeding, we observed less ZO-1 expression in the ileum of littermate mice, with a complete abrogation of its expression in *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* mice (**Figure 6E**). In addition, the architecture of the ileum is also altered in MCDD-fed *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* mice with smaller villi length compared to littermate controls (**Figure 6F**). These effects can be seen as early as 2 weeks of MCDD challenge (**Figure S5E**). This effect is restricted to the ileum, as ZO-1 expression in the colons of MCDD-fed *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* mice is not affected (**Figure S5F**). Furthermore, increased translocation of bacterial products such as LPS due to a disrupted intestinal barrier also contributes to MASLD progression [42,43]. We then assessed levels of gut-derived LPS in systemic blood circulation. As shown in **Figure 6G**, we detected more anti-LPS antibodies in MCDD-fed *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* compared to littermate controls. Collectively, our data suggest that modification of gut functions is associated with aggravation of liver injury observed in MCDD-fed

Ncr1^{iCre/+}*Cd44*^{flox/flox} mice, which could be explained by a predominant NK cell inflammatory phenotype.

LPS predisposes CD44-deficient NK cells to an inflammatory phenotype more likely to trigger the release of pro-inflammatory mediators by hepatocytes

It has been well established that PAMPs including LPS are main regulators of hepatic immune cell activation and sustaining liver inflammation. Thus, we exposed liver NK cells to LPS *in vitro* and we first analyzed metabolic pathways as it has been shown that NK cell functions are tightly dependent on glycolysis and/or oxidative phosphorylation [11] (**Figure 7A**). Using the SCENITH method which allows the evaluation of the metabolic activity at the cell level by flow cytometry [44], we showed that liver CD44-deficient NK cells preferentially increase their glycolytic capacity in response to LPS at the expense of oxidative phosphorylation (**Figure 7B**). To further evaluate the LPS-induced NK cell activation, we assessed their cytokine and chemokine profile (**Figure 7A**). LPS-treated CD44-deficient NK cells showed significantly higher expression of pro-inflammatory mediators including *Ifng*, *Csf2* (GM-CSF) and *Il6* compared to CD44-sufficient NK cells (**Figures 7C and 7D, respectively**). We confirmed that IFN- γ production is significantly much higher in LPS-treated CD44-deficient NK cells by ELISA (**Figure 7C**). Taken together, these findings suggested that CD44 deficient NK cells are more sensitive to LPS and could contribute to the aggravation of the hepatic necro-inflammation.

The inflammatory phenotype of CD44-deficient NK cells enhances the release of pro-inflammatory mediators by hepatocytes.

To validate that NK cells contribute to the local inflammation and liver damage during MASH, we then investigated the direct effect of cytokines derived from LPS-treated NK cells on hepatocytes *in vitro* (**Figure 8A**). Primary hepatocytes isolated from healthy mice were treated with the supernatant of LPS-treated CD44-deficient NK cells (Sup^{NK-CD44KO}) or LPS-treated CD44-sufficient NK cells (Sup^{NK-WT}). We showed that primary hepatocytes treated with LPS-Sup^{NK-CD44KO} increase the expression of pro-inflammatory mediators including *Tnfa*, *Il6* *Cxcl1* and oxidative stress markers including *nos2* and *gp91^{phox}* (**Figure 8B**). In addition to the expression, the secretion of the pro-inflammatory factors TNF- α and IL-6 was strongly enhanced in response to LPS-Sup^{NK-CD44KO} conditioned medium (**Figure 8C**). Collectively, these results suggested that activation of NK cells by LPS in the absence of CD44 could directly

induces hepatocyte oxidative stress and inflammatory damage which could sustain the chronic inflammation during steatohepatitis. Collectively, these results suggest that CD44 is a novel regulator of LPS-dependent NK cell responses. In addition, its absence may contribute to local inflammation by amplifying the expression of pro-inflammatory mediators by NK cells and hepatocytes, thereby promoting the steatohepatitis development.

DISCUSSION

It is now well established that chronic inflammation and activation of innate immune cells are essential features of MASLD. A growing body of evidence indicates that innate lymphoid cells and in particular, NK cells and ILC1s are important players in steatohepatitis pathogenesis [17, 45]. In this study, we demonstrate that steatohepatitis severity is positively correlated with hepatic and intestinal NKp46⁺ ILC numbers in murine dietary models of steatohepatitis/MASH. We show that CD44 negatively regulates NKp46⁺ ILC function, as its specific deletion within NKp46⁺ ILCs aggravates liver inflammation and injury, notably through the establishment of an inflammatory loop with hepatocytes. Preservation of NKp46⁺ ILC functions by CD44 is also necessary for gut architecture and permeability. These impairments of intestinal NKp46⁺ ILC functions amplify the crosstalk between liver and gut, with greater availability of PAMPs (LPS).

Our study showed that livers of CD44-deficient NKp46⁺ ILCs mice fed with MASH diets express higher levels of genes associated with myeloid cells (*cd11b*, *cd11c*, *ccl2*, *cd44*). Furthermore, flow cytometry analyses indicated an increase in the number and frequency of pro-inflammatory macrophages (F4/80⁺ CD11b^{high} CD11c⁺ macrophages). Hepatic macrophage infiltration has been demonstrated in mouse dietary models (high-fat diet (HFD) and MCDD) with a crucial role in MASH pathogenesis [46-48]. The liver is comprised of liver-resident Kupffer cells (KC) and recruited monocyte-derived macrophages. It has been proposed that KC are the first responders upon liver injury, secreting proinflammatory mediators such as TNF- α , CCL2, CXCL10 and in turn leading to recruitment of monocyte-derived macrophages[46,49]. Recently, an elegant study accurately characterized the dynamic and origin of the distinct liver macrophage subsets in MASH using the KC-specific markers Clec4F and Timp4. In MASH liver, the KC pool is maintained by proliferation and differentiation of short-lived monocyte-derived KC presumably due to increased pro-inflammatory mediators in the liver environment [50,51]. The role of IFN- γ in macrophage activation is well known, notably through the induction of pro-inflammatory cytokine secretions such as TNF- α or IL-1 β [52]. However, its mechanism in MASH context is still debated and IFN- γ seems to be more specifically involved in the priming of macrophages. IFN- γ could induce internal changes within macrophages, which would be responsible for the robust inflammatory response triggered by TLR ligands during macrophage activation [53,54]. Liver IFN- γ -derived NK cells is also important contributor of the polarization of pro-inflammatory macrophages which in turn sustain liver inflammation [22]. In line with this, we reported that IFN- γ production by LPS

treated -NK cells was strongly increased when CD44 is absent, suggesting a potential role of NK cell expressing CD44 in regulating liver IFN- γ levels and macrophage polarization. Regarding the direct role of LPS on NK cells, initial studies have supported this hypothesis by demonstrating that human NK cells express the LPS receptors TLR2 and TLR4 at the gene level [55-57]. In line with our results, *Kanevskiy et al.*, revealed that LPS had a stimulatory effect on IFN- γ production by human NK cells [58,59]. Whether CD44 and LPS receptors form complex at the cell surface of NK cells to trigger IFN- γ production still deserve further investigations. Indirect activation of NK cells by LPS could also occur in the liver. Activation of dendritic cells or macrophages through TLR4 receptor results in the production of IL-12 and IL-18, which in turn activate NK cell functions [60]. In the context of acute liver injury, liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) activated in response to LPS are important sources of myeloid cell-attracting chemokines such as CCL2 and CXCL10, which support NK cell recruitment and IFN- γ production [61]. Hepatocytes, the predominant cells in the liver capable of detecting pathogens such as LPS, also contribute to the regulation of hepatic cytokines and chemokines, leading to the recruitment of inflammatory cells to the liver [62]. Interestingly, we reported that isolated primary hepatocytes showed a huge increase in the expression of inflammatory and oxidative stress markers after stimulation with the supernatant of CD44-deficient NK cells activated with LPS. Our results are in line with a recent study showing that NK cells isolated from MASH liver, secrete pro-inflammatory cytokines able to activate the nuclear factor kappa B signaling pathway, responsible for the establishment of a significant inflammatory response by hepatocytes [23]. Thus, the worsening of MASH that we observed in CD44-deficient NKp46⁺ ILCs mice challenged with MASH diets could thus be explained by a greater responsiveness of NK cells to LPS and the existence of a major inflammatory loop between NK cells and hepatocytes.

In our mouse model of genetic deletion of CD44 in NKp46⁺ ILCs challenged with diet-induced MASH, we reported upregulation of genes associated with liver fibrogenesis (*coll1a1*, *timpl*, *tgfb*) associated with an elevation in liver injury and inflammatory macrophages. The later could overcome the anti-fibrogenic properties of NK cells [63]. Indeed, a previous report showing that NK cells have a protective role in the development of liver fibrosis in a mouse model of MASLD as in their absence macrophage polarization was skewed toward TGF- β producing alternative macrophages [22]. Liver NK cells can limit liver fibrosis by killing hepatic stellate cells (HSCs) *via* their cytotoxic activity. This mechanism is in part dependent of engagement of NK cell-activating receptors such as NKG2D and the TRAIL/TRAIL

receptors pathway [63-66]. Further, it has been also proposed that the cross talk between HSCs and NK cells is mediated through engagement of activating receptors NKp30, NKp46 or reduced engagement of inhibitory NK cell receptors [67-69]. It will be interesting in future investigation to evaluate the expression of activating receptors in CD44-deficient NK cells and their ability to recognize and kill to determine if CD44 also regulates the anti-fibrogenic properties of NK cells.

As mentioned before, the crosstalk between the gut and the liver is crucial during the development of MASH. In our study, we showed a dramatic loss of tight junction ZO-1 expression in CD44-deficient NKp46⁺ ILCs mice with the development of MASH. This was associated with increased gut permeability as evaluated by elevated serum levels of anti-LPS antibodies suggesting that gut bacterial compounds have crossed the epithelium and have reached the bloodstream. These events could also contribute to the aggravation of MASH in our mice. In accordance with these observations, previous reports have shown that MASH diets induce alteration of the intestinal epithelial barrier and mice with defects in gut barrier (JAM-A KO mice) develop more severe steatohepatitis than control mice [70-72]. Preclinical models of MASLD/MASH and studies in patients with MASH have demonstrated a key contribution of gut dysfunction to the sustained immune activation in the liver, thereby aggravating the disease[71,73]. Dysbiosis-driven inflammation and impaired barrier functions are key mechanisms leading to enhanced intestinal permeability and subsequent leakage of bacterial products such as LPS to the liver *via* the portal system [74-76]. Subsequently, all of these events contribute to sustain liver inflammatory responses through pattern recognition receptors expressed by immune cells or hepatocytes.

As extensively reviewed, subsets of ILCs are abundant at mucosal sites and thus contribute to the maintenance of gut homeostasis in steady state and stress conditions. NKp46⁺ ILCs, that comprise bona fide NK cells, ILC1s and subsets of ILC3s, have been identified in the intestinal mucosa of mice (epithelium and lamina propria) and have been implicated in intestinal inflammation [77-79]. In our study, CD44 deletion in NKp46⁺ ILCs induces lower numbers of gut NK cells and ILC1s but did not alter the number of NKp46⁺ ILC3s. These latter have been described to play a protective role in mice developing metabolic syndrome associated with obesity and steatohepatitis [80-82]. We observed gut changes (architecture, LPS leakage) in CD44-deficient NKp46⁺ ILCs mice suggesting that the putative protective role of NKp46⁺ ILC3s in the disease may be counterbalanced by a more deleterious role of intestinal NK cells and/or ILC1s. In further studies, it will be necessary to investigate cytokine production within

gut NKp46⁺ ILCs subsets to better understand their relative contribution to the cross talk between liver and gut during MASH.

Our results also highlight that targeting CD44 as a therapeutic approach requires further study and limitations. We have previously reported in a pilot study that systemic targeting of CD44 by genetic deficiency and neutralization prevents and corrects MASH, respectively. These approaches first affect cells that strongly express CD44 and are highly present in organs (macrophages, neutrophils) [26]. Future investigations will be necessary to increase the specificity of the tools (targeting CD44 mainly in myeloid cells) and to adjust the dose and duration of treatment according to the results and side effects (targeting NK cells).

In conclusion, we showed that specific deletion of CD44 in NKp46⁺ ILCs represents a yet unknown mechanism of regulation of liver homeostasis during MASLD progression. Through our ex vivo approaches on NK cells, we have highlighted a potential role for CD44 in regulating LPS-mediated activation of NK cells. CD44-invalidated NK cells stimulated with LPS have their metabolic and functional activity increase, leading to the establishment of an inflammatory loop with hepatocytes. In line with these results, mice depleted in CD44 in NKp46⁺ ILCs have increased infiltration of inflammatory macrophages associated with increased liver injury and fibrosis as well as alteration of gut barrier integrity. Finally, in the liver of patients with obesity and MASLD, expression of NK cell marker correlates with expression of CD44 and macrophage markers. Altogether, our study provides more insight into the pathogenesis of MASH/MASLD and should help to better understand the pathophysiology of the disease.

ABBREVIATIONS : ALT : Alanine aminotransferase , AST : Aspartate aminotransferase, BMI : Body Mass Index , CCL2 : Chemokine CC ligand 2, CCL5 : Chemokine CC ligand 5, CD : Control diet, Clec4F : C-type lectin domain family 4 Member F, Col1a1 : Collagen type 1 alpha 1, Csf2 : Colony-stimulated factor 2, CXCL1 : CXC motif chemokine ligand 1, CXCL10 : CXC motif chemokine ligand 10, FMO : Fluorescence Minus One, GM-CSF : Granulocyte Macrophages Colony Stimulating Factor, H&E : Hematoxylin and Eosin, HCV : Hepatitis C virus , HFD : High-fat diet, HOMA-IR : Homeostatic model assessment index , IFN γ : Interferon de type II gamma, IL-6 : Interleukin-6, IL-12: Interleukin-12, IL-15: Interleukin-15, IL-18: Interleukin-18, IL-22 : Interleukin-22, ILCs : Innate Lymphoid Cells, JAM-A : Junction Adhesion Molecule-A, KC : Kupffer Cells, KO : Knock-Out, LPS : Lipopolysaccharide, LSEC : Liver Sinusoidal Endothelial Cells, LTi : Lymphoid Tissue-Inducer cells, Ly6C : Lymphocyte antigen 6 complex locus C1, Ly6G : Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D, MASH : Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis , MASLD : Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MCDD : Methionine and Choline-deficient diet , NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Diseases , NAS : MASLD activity score, Ncr1 : Natural cytotoxicity triggering receptor 1, NK : Natural Killer, Nkp46 : Natural killer cell p46-related protein, Nos2 : Nitric oxide synthase 2, OPN : Osteopontin, PRRs : Pattern Recognition Receptors, ROR γ t : RAR-related orphan receptor gamma, Spp1 : secreted phosphoprotein 1, STAT : signal transducer and activator of transcription , Tgfb : Transforming growth factor beta, Timp1 : TIMP Metallopeptidase inhibitor 1, Timp4: TIMP Metallopeptidase inhibitor 4, TLR : Toll like receptor, TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha, TRAIL : Tumor-Necrosis-factor related apoptosis inducing ligand, WT : Wild Type, ZO-1: Zonula Occludens-1.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank present and former members of Dr. Philippe Gual's laboratory for their helpful advice and suggestions, the C3M animal facilities and the cytometry platform. We are grateful to Pr. Eric Vivier (CIML, Innate Pharma, Marseille, France) for providing *Ncr1*^{iCre} mice, and Dr Jeanne Tran-Van-Nhieu (CHU Henri Mondor, Department of Pathology, AP-HP - Université Paris Est Créteil, Créteil, France) for providing the liver samples from lean subjects. We would also like to thank Catherine Buchanan for her assistance with English syntax and grammar in this manuscript.

Table 1. Patient characteristics

	Without MASLD	With MASLD
n	7	13
Age (years)	35.2 ± 5.0	39.1 ± 2.8
BMI (kg/m ²)	43.0 ± 0.4	42.8 ± 1.3
ALT (IU/L)	14.7 ± 1.4	62.7 ± 19.3*
AST (IU/L)	18.1 ± 1.4	40.3 ± 11.3*
Fasting insulin (mIU/L)	10.5 ± 2.6	19.9 ± 4.0
Fasting glucose (mmol/L)	4.8 ± 0.1	6.3 ± 0.6*
HOMA-IR	2.2 ± 0.4	5.7 ± 1.2*
HbA1c (%)	5.3 ± 0.1	6.2 ± 0.3*
NAFLD Activity Score (n)	0 (7)	3 (8) 5 (5)
Grade of steatosis (n)	0 (7)	3 (13)
Lobular inflammation (n)	0 (7)	0 (8) 1 (5)
Hepatocellular ballooning (n)	0 (7)	0 (8) 1 (5)
Hepatic gene expression		
<i>Cd44</i>	1.37 ± 0.12	2.76 ± 0.41**
<i>Cd68</i>	1.15 ± 0.14	1.84 ± 0.18*

Without MASLD: patients with normal liver histology; With MASLD: patients with MASLD features (steatosis without or with lobular inflammation and hepatocellular ballooning). Data are expressed as mean ± SEM and compared using the non-parametric Mann Whitney test: * P<0.05, ** P<0.01 compared with “Without MASLD” group.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Liver NKp46⁺ ILCs and NK cells are related to the development of liver injury, steatosis and inflammation. Wild-type mice fed a control diet (CD) or methionine-choline-deficient diet (MCDD) for 2, 4 or 7 weeks (W2, W4, W7). (A) Representative hematoxylin and eosin (H&E) and sirius red staining of liver tissue sections and (B) serum level of ALT from WT mice fed with CD or MCDD. Histograms represent mean values \pm SEM of 2 independent experiments (n= 4-5 mice/group), *p<0.05, **p<0.01 Kruskal Wallis one-way ANOVA. (C) NKp46⁺ ILC number evaluated by flow cytometry in livers of WT mice fed with CD or MCDD. Histograms represent mean values \pm SEM of 2 independent experiments (n=5 mice/group), *p<0.05, ***p<0.001 Kruskal Wallis one-way ANOVA. (D) Correlation between the number of hepatic NKp46⁺ ILCs and grade of steatosis, number of inflammatory foci and ALT level from WT mice fed with CD (white circles) or MCDD (black circles) (2 independent experiments, n=3 mice/group). Linear regression curve, Spearman r value, and p value (95% confidence interval) are shown. (E) Representative flow cytometry dot plots showing frequencies of liver CD49a⁺ ILC1s and CD49b⁺ NK cells after gating on CD45⁺ CD3⁻ NKp46⁺ cells. NK cell/ILC1 ratio was determined in WT mice fed with CD or MCDD (2 independent experiments, n=5 mice/group), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 Kruskal Wallis one-way ANOVA. (F) Correlation between the number of hepatic NK cells and grade of steatosis, number of inflammatory foci and ALT level from WT mice fed with CD (white circles) or MCDD (black circles) (2 independent experiments, n=3 mice/group). Linear regression curve, Spearman r value, and p value (95% confidence interval) are shown.

Figure 2. CD44 deficiency in NKp46⁺ ILCs affects liver NK and ILC1 numbers after 4 weeks of MCDD challenge. (A) Representative histogram plots showing cell surface expression of CD44 on liver CD49a⁺ ILC1s (red line) and CD49b⁺ NK cells (blue line) after gating on hepatic CD45⁺ CD3⁻ NKp46⁺ cells from WT naïve mice. FMO : fluorescence minus one + isotype control antibody (black dotted line). (B) Representative histogram plots showing the expression level of CD44 in liver NK cells and ILC1s of naïve NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice compared to naïve NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} littermate mice. (C) Number of NKp46⁺ ILCs evaluated by flow cytometry in livers of NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} under a standard diet. Histogram bars represent mean values \pm SEM of two independent experiments (n=4-7 mice/group) *p<0.05, Mann-Whitney U test. (D) Hepatic *Ncr1* mRNA levels was evaluated by real-time quantitative PCR in NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice fed with CD or MCDD. Data are presented as relative mRNA

expression levels normalized to the $\beta 2M$ mRNA level. Histograms represent mean values \pm SEM of 4 independent experiments (n=11-15 mice/ group) **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 two-way ANOVA. (E) NKp46⁺ ILC, NK cell and ILC1 number was evaluated by flow cytometry in livers of NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice under CD or MCDD. Histograms represent mean values \pm SEM of 4 independent experiments (3 independent experiments, n=18-31 mice/group), *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001, n.s: not significant two-way ANOVA.

Figure 3. CD44 deficiency in NKp46⁺ ILCs aggravated liver abnormalities after 4 weeks of MCDD challenge. NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice fed a CD or MCDD for 4 weeks. Histograms represent mean values \pm SEM of 4 independent experiments (3 independent experiments, n=8-23 mice/group) with (A) Evaluation of liver inflammatory macrophages (F4/80⁺ CD11b^{high}CD11c⁺/CD45⁺) frequency and number, *p<0.001, ***p<0.001, ****p<0.0001, two-way ANOVA. (B) Hepatic mRNA expression levels of inflammatory associated-markers evaluated by real-time quantitative PCR. All real-time quantitative PCR data are presented as relative mRNA expression levels normalized to the $\beta 2M$ mRNA level. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, two-way ANOVA. The serum level of ALT (C) and hepatic mRNA expression levels of fibrotic genes (D). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, two-way ANOVA. (E) Representative Sirius red staining of liver tissue sections (left panel) and quantification of collagen area in tissue sections (right panel).

Figure 4. CD44 deficiency in NKp46⁺ ILCs affected their distribution and aggravated liver abnormalities after 24 weeks on Western Diet.

(A) Hepatic *Ncr1* mRNA levels was evaluated by real-time quantitative PCR in NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice fed with CD or Western Diet. Data are presented as relative mRNA expression levels normalized to the $\beta 2M$ mRNA level. Histograms represent mean values \pm SEM of 2 independent experiments (n=4-10 mice/ group) *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001, two-way ANOVA. (B) NKp46⁺ ILC, NK cell and ILC1 number was evaluated by flow cytometry in livers of NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice under CD or Western Diet. Histograms represent mean values \pm SEM of 2 independent experiments (n=4-10 mice/group), **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, two-way ANOVA.. (C) Hepatic mRNA expression levels of inflammatory associated-markers evaluated by real-time quantitative PCR. All real-time quantitative PCR data are presented as relative mRNA

expression levels normalized to the $\beta 2M$ mRNA level. Histograms represent mean values \pm SEM of 2 independent experiments (n=4-10 mice/group), *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001, two-way ANOVA. The serum level of ALT (D) and hepatic mRNA expression levels of fibrotic genes (E). Histograms represent mean values \pm SEM of 2 independent experiments (n=4-10 mice/group), *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001, two-way ANOVA. (F) Representative Sirius red staining of liver tissue sections (left panel) and quantification of collagen area in tissue sections (right panel).

Figure 5. Hepatic *Eomesodermin* expression correlates with *Ncr1*, *Cd44* and *Cd68* expression in livers of obese patients. (A) Liver *Eomesodermin* mRNA expression levels evaluated by real-time quantitative PCR in lean patients (n=5), in morbidly obese patients without MASLD (n=7) and with MASLD (n=13). Data are presented as relative mRNA level normalized to the *RPLP0* mRNA level. Histograms represent mean values \pm SEM *p<0.05, ***p<0.001, Mann-Whitney U test. Correlation between hepatic *Eomesodermin* and steatosis grade (B), *Cd44* and *Cd68* mRNA expression levels (C) (fold versus lean) in morbidly obese patients without (white circles) and with (black circles) MASLD. Linear regression curve, Spearman r value, and p value (95% confidence interval) are shown.

Figure 6. CD44 deficiency in NKp46⁺ ILCs affects gut NKp46⁺ ILC numbers and modifies gut function after 4 weeks of MCDD challenge. (A) Representative histogram plots showing the gating strategy to identify CD49b⁺ NK cells, CD49a⁺ ILC1s, NKp46⁺ ROR γ t⁺ ILC3s and NKp46⁺ ROR γ t⁻ ILC3s (left panel) from CD45⁺ Lin⁻ cells (Lin⁻: CD3⁻, CD8⁻, TCR β ⁻, CD19⁻, Gr1⁻, TCR γ / δ ⁻, Fc ϵ ⁻). Histogram plots showing CD44 surface expression in the different groups of gut ILCs of WT naïve mice: CD49b⁺ NK cells (blue line), CD49a⁺ ILC1s (red line), NKp46⁺ ILC3s (green line), NKp46⁺ ILC3s (purple line) and Fluorescence Minus One (FMO + isotype control) is represented in grey. Numbers represent the mean fluorescence intensity of CD44 for each population gated. (B) Representative histogram plots showing the specific deletion of CD44 in NK cells, ILC1s, NKp46⁺ ILC3s, and NKp46⁻ ILC3s of naïve NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice compared to NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} littermate mice. NKp46⁺ ILC (C), ILC1 and NK cell number (D) evaluated by flow cytometry from pooled gut lamina propria of NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice after CD or MCDD. Histograms represent mean values \pm SEM of 3 independent experiments (n=4-6mice/group), *p<0.05, **p<0.01 two-way ANOVA. (E) Representative ZO-1 expression determined by immunohistochemistry from ileum section of NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox}

mice after 4 weeks of CD or MCDD (n=3 or 4 mice/group). (F) Villi length quantification (10 villi were measured/mice ; n=3 or 4 mice/group) and (G) measurement of seric total IgG directed against *E. coli* LPS was evaluated by ELISA assay in NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice. Histograms represent mean values \pm SEM of 3 independent experiments (n=12-17 mice/group), *p<0.05, ****p<0.0001, two-way ANOVA.

Figure 7. The specific invalidation of CD44 in NK cells undergoes an increase in glycolytic capacity and inflammatory profile after LPS stimulation.

(A) Schematic diagram for analysis of NK cells metabolism and derived cytokine produced after LPS stimulation. (B) Determination of NK cell glycolytic capacity and mitochondrial dependence measured by Scenith experiment after LPS stimulation (5h 1 μ g/mL) of the non-parenchymal fraction of NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice. Histograms represent mean values \pm SEM of 3 independent experiments (n=8-9 mice/group), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, two-way ANOVA. (C) NK cell mRNA expression of *Ifng* evaluated by real-time quantitative PCR and IFN γ protein level measured by ELISA assay in the supernatant of NK cells stimulated with LPS (1 μ g/mL) during 5h. (D) NK cell mRNA expression of inflammatory associated markers evaluated by real-time quantitative PCR. Real-time quantitative PCR data are presented as relative mRNA expression levels normalized to the β 2M mRNA level. Histograms represent mean values \pm SEM of 3 independent experiments (n=10-11 mice/group) *p<0.05, **p<0.01, two-way ANOVA. Histograms represent mean values \pm SEM of 2 independent experiments (n=5 mice/group) *p<0.05, **p<0.01, two-way ANOVA.

Figure 8. Primary hepatocytes stimulated with the supernatant of CD44-invalidated NK cells activated with LPS induce an increase in the expression and secretion of proinflammatory cytokines.

(A) Schematic diagram of NK cells derived supernatant treatment on hepatocytes. (B) Primary hepatocyte mRNA expression levels of inflammatory and oxidative stress markers after 24h of stimulation with the supernatant of WT-NK cells and CD44-invalidated NK cells, activated with LPS. Real-time quantitative PCR data are presented as relative mRNA expression levels normalized to the *Rplp0* mRNA level. Histograms represent mean values \pm SEM of 3 independent experiments (n=10-11 mice/group) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 two-way ANOVA. (C) Cytokine levels measured by ELISA assay in the supernatant of primary hepatocyte after their stimulation. Histograms represent mean values \pm

SEM of 3 independent experiments (n=9-13 mice/group) *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001, two-way ANOVA.

Supplementary Figure 1. Liver NKp46⁺ ILC behavior is related to the development of liver injury, steatosis and inflammation after MCDD challenge. (A) Steatosis frequency (left panel) and inflammatory foci number (right panel) in livers of WT mice fed with CD or MCDD for 2,4 and 7 weeks. Histograms represent mean values \pm SEM of 3 independent experiments (n= 4-5 mice/group), *p<0.05 Kruskal Wallis one-way ANOVA. (B) Hepatic *Ncr1* mRNA expression levels evaluated by real-time quantitative PCR in livers of WT mice fed with CD or MCDD. Histograms represent mean values \pm SEM of 3 independent experiments (n= 4-5 mice/group), *p<0.05, **p<0.01, n.s: not significant, Kruskal Wallis one-way ANOVA. (C) Correlation between hepatic *Ncr1* mRNA expression levels and steatosis frequency, number of inflammatory foci and ALT level, in livers of WT mice fed with CD (white circles) or MCDD (black circles) (3 independent experiments, n=4-5 mice/group). Linear regression curve, Spearman r value, and p value (95% confidence interval) are shown. (D) Representative histogram plot showing Eomesodermin expression on liver ILC1 (solid grey line) and NK cells (solid black line) with isotype control (dotted black line). (E) Hepatic *Eomesodermin* mRNA expression levels evaluated by real-time quantitative PCR in livers of WT mice fed with CD or MCDD. Histograms represent mean values \pm SEM of 3 independent experiments (n= 4-5 mice/group), *p<0.05, Kruskal Wallis one-way ANOVA. (F) Correlation between hepatic *Eomesodermin* and hepatic *Ncr1* mRNA expression levels in WT mice fed with CD or MCDD. Linear regression curve, Spearman r value, and p value (95% confidence interval) are shown. White circles (without MASLD) and black circles (with MASLD).

Supplementary Figure 2. CD44 influences liver NKp46⁺ ILC behavior in MASH.

(A) Hepatic *Cd44* mRNA expression levels evaluated by real-time quantitative PCR and correlation between hepatic *Ncr1* and hepatic *Cd44* mRNA expression levels in WT mice fed with CD (white circles, without MASLD) or MCDD (black circles, with MASLD) for 2, 4 and 7 weeks. Linear regression curve, Spearman r value, and p value (95% confidence interval) are shown. Histograms represent mean values \pm SEM of 3 independent experiments (n= 4-5 mice/group), *p<0.05, *p<0.001, n.s: not significant Kruskal Wallis one-way ANOVA. (B) Representative histogram plots showing the expression level of CD44 in liver ILC2s and T cells of naïve NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice compared to naïve NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} littermate. (C) Hepatic mRNA expression levels of *IL15* evaluated by real-time quantitative PCR. Data are

presented as relative mRNA expression levels normalized to the $\beta 2M$ mRNA level. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, two-way ANOVA. (D) NK cell/ILC1 ratio was determined in livers of NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice fed with CD or MCDD for 4 weeks. Histograms represent mean values \pm SEM of 4 independent experiments (n=21-23 mice/group), **** $p < 0.0001$, Mann-Whitney U test.

Supplementary Figure 3. Distribution of myeloid cells in liver and blood of *Ncr1*^{+/+}CD44^{flox/flox} littermate and *Ncr1*^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice after 4 weeks of MCDD. (A)

(A) NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice fed a CD or MCDD for 4 weeks. Histograms represent mean values \pm SEM of 4 independent experiments (3 independent experiments, n=8-23 mice/group) with hematoxylin and Eosin (H&E) staining of liver tissue sections and quantification of hepatic steatosis (left panel), and quantification of inflammatory foci from H&E staining of liver tissue sections (right panel), *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, two-way ANOVA. (B) Representative flow cytometry gating strategy of liver cells allowing identification of monocytes, neutrophils and macrophages. (C) Hepatic frequencies of neutrophils (Ly6G⁺Ly6C^{int}) and monocytes (Ly6C^{high}) among CD45⁺ leukocytes were determined by flow cytometry in NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice fed with CD or MCDD. Histograms represent mean values \pm SEM of 4 independent experiments (n=21-23 mice/group), ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, two-way ANOVA. (D) Frequency and number of blood neutrophils and monocytes were evaluated by automated differential cell counting in NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice fed with CD or MCDD. Histograms represent mean values \pm SEM of 4 independent experiments (n=8-15 mice/group), *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, n.s: not significant, two-way ANOVA.

Supplementary Figure 4. Impact of Western Diet on body weight and liver appearance in *Ncr1*^{+/+}CD44^{flox/flox} littermate and *Ncr1*^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice.

Body weight (A) and liver appearance (B) after 24 weeks of Western Diet in NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-way ANOVA.

Supplementary Figure 5. Gut ILCs behavior and ileon and colon zonula occludens-1 expression in *Ncr1*^{+/+}CD44^{flox/flox} littermate and *Ncr1*^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice after 4 weeks of MCDD challenge. (A)

Histogram plots showing CD44 surface expression in gut Lin⁻gata3⁺ ILC2s of WT naïve mice (purple line). Fluorescence Minus One (FMO) + isotype control

antibody is represented in grey. Numbers represent the mean fluorescence intensity of CD44 for each population gated. **(B)** Histogram plots showing CD44 surface expression in gut Lin⁻gata3⁺ ILC2s in NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice and NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} littermate mice fed with MCDD (right panel). **(C)** NK cell/ILC1 ratio was determined in guts of NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice fed with CD or MCDD for 4 weeks. Histograms represent mean values \pm SEM of 3 independent experiments (n=4-6mice/group), *p<0.05, two-way ANOVA. **(D)** Frequency and number of NKp46⁺ ROR γ t⁺ ILC3s evaluated by flow cytometry in gut lamina propria of NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice fed with CD or MCDD. Histograms represent mean values \pm SEM of 3 independent experiments (n=4-6mice/group). ZO-1 expression was determined by Immunohistochemistry in the ileum after 2 weeks of CD or MCDD **(E)** and colon of CD or MCDD **(F)** of NKp46^{+/+}CD44^{flox/flox} and NKp46^{iCre/+}CD44^{flox/flox} mice.

REFERENCES

- [1] Rinella ME, Lazarus JV, Ratzliff V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Hepatology* 2023;78:1966-1986.
- [2] Luci C, Bourinet M, Leclere PS, Anty R, Gual P. Chronic Inflammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:597648.
- [3] Nier A, Engstler AJ, Maier IB, Bergheim I. Markers of intestinal permeability are already altered in early stages of non-alcoholic fatty liver disease: Studies in children. *PLoS One* 2017;12:e0183282.
- [4] Grabherr F, Grander C, Effenberger M, Adolph TE, Tilg H. Gut Dysfunction and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10:611.
- [5] Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 2013;62:1787-1794.
- [6] Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001;48:206-211.
- [7] Saltzman ET, Palacios T, Thomsen M, Vitetta L. Intestinal Microbiome Shifts, Dysbiosis, Inflammation, and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Microbiol* 2018;9:61.
- [8] Barrow AD, Colonna M. Innate lymphoid cell sensing of tissue vitality. *Curr Opin Immunol* 2019;56:82-93.
- [9] Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* 2018;174:1054-1066.
- [10] Gasteiger G, Fan X, Dikiy S, Lee SY, Rudensky AY. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science* 2015;350:981-985.
- [11] Cong J. Metabolism of Natural Killer Cells and Other Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol* 2020;11:1989.
- [12] Michelet X, Dyck L, Hogan A, Loftus RM, Duquette D, Wei K, et al. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. *Nat Immunol* 2018;19:1330-1340.
- [13] Littwitz-Salomon E, Moreira D, Frost JN, Choi C, Liou KT, Ahern DK, et al. Metabolic requirements of NK cells during the acute response against retroviral infection. *Nat Commun* 2021;12:5376.
- [14] Luci C, Reynders A, Ivanov, II, Cognet C, Chiche L, Chasson L, et al. Influence of the transcription factor RORgammat on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. *Nat Immunol* 2009;10:75-82.
- [15] Sanos SL, Bui VL, Mortha A, Oberle K, Heners C, Johner C, et al. RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* 2009;10:83-91.
- [16] Satoh-Takayama N, Dumoutier L, Lesjean-Pottier S, Ribeiro VS, Mandelboim O, Renaud JC, et al. The natural cytotoxicity receptor NKp46 is dispensable for IL-22-mediated innate intestinal immune defense against *Citrobacter rodentium*. *J Immunol* 2009;183:6579-6587.
- [17] Bourinet M, Anty R, Gual P, Luci C. Roles of innate lymphoid cells in metabolic and alcohol-associated liver diseases. *JHEP Rep* 2024;6:100962.

- [18] O'Rourke RW, Metcalf MD, White AE, Madala A, Winters BR, Maizlin, II, et al. Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:978-990.
- [19] O'Sullivan TE, Rapp M, Fan X, Weizman OE, Bhardwaj P, Adams NM, et al. Adipose-Resident Group 1 Innate Lymphoid Cells Promote Obesity-Associated Insulin Resistance. *Immunity* 2016;45:428-441.
- [20] Lee BC, Kim MS, Pae M, Yamamoto Y, Eberle D, Shimada T, et al. Adipose Natural Killer Cells Regulate Adipose Tissue Macrophages to Promote Insulin Resistance in Obesity. *Cell Metab* 2016;23:685-698.
- [21] Boulouvar S, Michelet X, Duquette D, Alvarez D, Hogan AE, Dold C, et al. Adipose Type One Innate Lymphoid Cells Regulate Macrophage Homeostasis through Targeted Cytotoxicity. *Immunity* 2017;46:273-286.
- [22] Tosello-Tramont AC, Krueger P, Narayanan S, Landes SG, Leitinger N, Hahn YS. NKp46(+) natural killer cells attenuate metabolism-induced hepatic fibrosis by regulating macrophage activation in mice. *Hepatology* 2016;63:799-812.
- [23] Wang F, Zhang X, Liu W, Zhou Y, Wei W, Liu D, et al. Activated Natural Killer Cell Promotes Nonalcoholic Steatohepatitis Through Mediating JAK/STAT Pathway. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2022;13:257-274.
- [24] Jiang X, Melum E. The Role of Natural Killer Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis: An Ongoing Debate. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2022;13:348-349.
- [25] Bourayou E, Perchet T, Meunier S, Bouvier H, Mailhe MP, Melanitou E, et al. Bone marrow monocytes sustain NK cell-poiesis during non-alcoholic steatohepatitis. *Cell Rep* 2024;43:113676.
- [26] Patouraux S, Rousseau D, Bonnafous S, Lebeaupin C, Luci C, Canivet CM, et al. CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2017;67:328-338.
- [27] Jordan AR, Racine RR, Hennig MJ, Lokeshwar VB. The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment. *Front Immunol* 2015;6:182.
- [28] Johnson P, Ruffell B. CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009;8:208-220.
- [29] Ali AJ, Abuelela AF, Merzaban JS. An Analysis of Trafficking Receptors Shows that CD44 and P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Collectively Control the Migration of Activated Human T-Cells. *Front Immunol* 2017;8:492.
- [30] Klement JD, Paschall AV, Redd PS, Ibrahim ML, Lu C, Yang D, et al. An osteopontin/CD44 immune checkpoint controls CD8+ T cell activation and tumor immune evasion. *J Clin Invest* 2018;128:5549-5560.
- [31] Qadri M, Almadani S, Jay GD, Elsaid KA. Role of CD44 in Regulating TLR2 Activation of Human Macrophages and Downstream Expression of Proinflammatory Cytokines. *J Immunol* 2018;200:758-767.
- [32] Dong Y, Poon GFT, Arif AA, Lee-Sayer SSM, Dosanjh M, Johnson P. The survival of fetal and bone marrow monocyte-derived alveolar macrophages is promoted by CD44 and its interaction with hyaluronan. *Mucosal Immunol* 2018;11:601-614.
- [33] Narni-Mancinelli E, Chaix J, Fenis A, Kerdiles YM, Yessaad N, Reynders A, et al. Fate mapping analysis of lymphoid cells expressing the NKp46 cell surface receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:18324-18329.
- [34] Shatirishvili M, Burk AS, Franz CM, Pace G, Kastilan T, Breuhahn K, et al. Epidermal-specific deletion of CD44 reveals a function in keratinocytes in response to mechanical stress. *Cell Death Dis* 2016;7:e2461.
- [35] Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004;27:1487-1495.

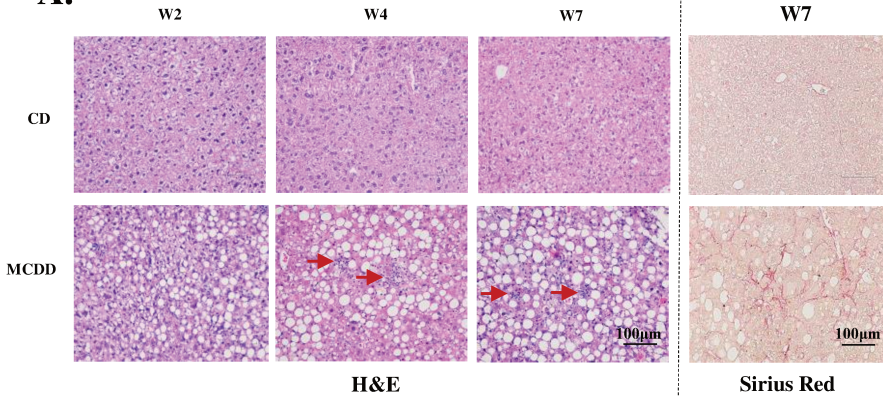
- [36] Kleiner DE. The liver biopsy in chronic hepatitis C: a view from the other side of the microscope. *Semin Liver Dis* 2005;25:52-64.
- [37] Riggan L, Freud AG, O'Sullivan TE. True Detective: Unraveling Group 1 Innate Lymphocyte Heterogeneity. *Trends Immunol* 2019;40:909-921.
- [38] Seillet C, Brossay L, Vivier E. Natural killers or ILC1s? That is the question. *Curr Opin Immunol* 2021;68:48-53.
- [39] Peng H, Jiang X, Chen Y, Sojka DK, Wei H, Gao X, et al. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J Clin Invest* 2013;123:1444-1456.
- [40] Sojka DK, Plougastel-Douglas B, Yang L, Pak-Wittel MA, Artyomov MN, Ivanova Y, et al. Tissue-resident natural killer (NK) cells are cell lineages distinct from thymic and conventional splenic NK cells. *Elife* 2014;3:e01659.
- [41] Marotel M, Hasan U, Viel S, Marcais A, Walzer T. Back to the drawing board: Understanding the complexity of hepatic innate lymphoid cells. *Eur J Immunol* 2016;46:2095-2098.
- [42] Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 2012;482:179-185.
- [43] Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology* 2014;146:1513-1524.
- [44] Arguello RJ, Combes AJ, Char R, Gigan JP, Baaziz AI, Bousiquot E, et al. SCENITH: A Flow Cytometry-Based Method to Functionally Profile Energy Metabolism with Single-Cell Resolution. *Cell Metab* 2020;32:1063-1075 e1067.
- [45] Luci C, Vieira E, Perchet T, Gual P, Golub R. Natural Killer Cells and Type 1 Innate Lymphoid Cells Are New Actors in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Immunol* 2019;10:1192.
- [46] Tosello-Trampont AC, Landes SG, Nguyen V, Novobrantseva TI, Hahn YS. Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor-alpha production. *J Biol Chem* 2012;287:40161-40172.
- [47] Remmerie A, Martens L, Scott CL. Macrophage Subsets in Obesity, Aligning the Liver and Adipose Tissue. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:259.
- [48] Tran S, Baba I, Poupel L, Dussaud S, Moreau M, Gelineau A, et al. Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis. *Immunity* 2020;53:627-640 e625.
- [49] Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C, et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* 2009;50:261-274.
- [50] Scott CL, Zheng F, De Baetselier P, Martens L, Saeys Y, De Prijck S, et al. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat Commun* 2016;7:10321.
- [51] Devisscher L, Scott CL, Lefere S, Raevens S, Bogaerts E, Paridaens A, et al. Non-alcoholic steatohepatitis induces transient changes within the liver macrophage pool. *Cell Immunol* 2017;322:74-83.
- [52] Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11:723-737.
- [53] Chen J, Ivashkiv LB. IFN-gamma abrogates endotoxin tolerance by facilitating Toll-like receptor-induced chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:19438-19443.
- [54] Wu C, Xue Y, Wang P, Lin L, Liu Q, Li N, et al. IFN-gamma primes macrophage activation by increasing phosphatase and tensin homolog via downregulation of miR-3473b. *J Immunol* 2014;193:3036-3044.

- [55] Saikh KU, Lee JS, Kissner TL, Dyas B, Ulrich RG. Toll-like receptor and cytokine expression patterns of CD56+ T cells are similar to natural killer cells in response to infection with Venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J Infect Dis* 2003;188:1562-1570.
- [56] Lauzon NM, Mian F, MacKenzie R, Ashkar AA. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell Immunol* 2006;241:102-112.
- [57] Mian MF, Lauzon NM, Andrews DW, Lichty BD, Ashkar AA. FimH can directly activate human and murine natural killer cells via TLR4. *Mol Ther* 2010;18:1379-1388.
- [58] Kanevskiy LM, Telford WG, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. Lipopolysaccharide induces IFN-gamma production in human NK cells. *Front Immunol* 2013;4:11.
- [59] Kanevskiy LM, Erokhina SA, Streltsova MA, Ziganshin RH, Telford WG, Sapozhnikov AM, et al. The Role of O-Antigen in LPS-Induced Activation of Human NK Cells. *J Immunol Res* 2019;2019:3062754.
- [60] Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 2005;106:2252-2258.
- [61] Papaioannou S, See JX, Jeong M, De La Torre C, Ast V, Reiners-Koch PS, et al. Liver sinusoidal endothelial cells orchestrate NK cell recruitment and activation in acute inflammatory liver injury. *Cell Rep* 2023;42:112836.
- [62] Luci C, Vieira E, Bourinet M, Rousseau D, Bonnafous S, Patouraux S, et al. SYK-3BP2 Pathway Activity in Parenchymal and Myeloid Cells Is a Key Pathogenic Factor in Metabolic Steatohepatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2022;13:173-191.
- [63] Fasbender F, Widera A, Hengstler JG, Watzl C. Natural Killer Cells and Liver Fibrosis. *Front Immunol* 2016;7:19.
- [64] Tosello-Trampont A, Surette FA, Ewald SE, Hahn YS. Immunoregulatory Role of NK Cells in Tissue Inflammation and Regeneration. *Front Immunol* 2017;8:301.
- [65] Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. 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* 2006;130:435-452.
- [66] Li T, Yang Y, Song H, Li H, Cui A, Liu Y, et al. Activated NK cells kill hepatic stellate cells via p38/PI3K signaling in a TRAIL-involved degranulation manner. *J Leukoc Biol* 2019;105:695-704.
- [67] Gur C, Doron S, Kfir-Erenfeld S, Horwitz E, Abu-Tair L, Safadi R, et al. NKp46-mediated killing of human and mouse hepatic stellate cells attenuates liver fibrosis. *Gut* 2012;61:885-893.
- [68] Mantovani S, Mele D, Oliviero B, Barbarini G, Varchetta S, Mondelli MU. NKp30 isoforms in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Immunology* 2015;146:234-242.
- [69] Muhanna N, Abu Tair L, Doron S, Amer J, Azzeh M, Mahamid M, et al. Amelioration of hepatic fibrosis by NK cell activation. *Gut* 2011;60:90-98.
- [70] Rahman K, Desai C, Iyer SS, Thorn NE, Kumar P, Liu Y, et al. Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology* 2016;151:733-746 e712.
- [71] Cheng C, Tan J, Qian W, Zhang L, Hou X. Gut inflammation exacerbates hepatic injury in the high-fat diet induced NAFLD mouse: Attention to the gut-vascular barrier dysfunction. *Life Sci* 2018;209:157-166.
- [72] Mouries J, Brescia P, Silvestri A, Spadoni I, Sorribas M, Wiest R, et al. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. *J Hepatol* 2019;71:1216-1228.
- [73] Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* 2016;63:764-775.

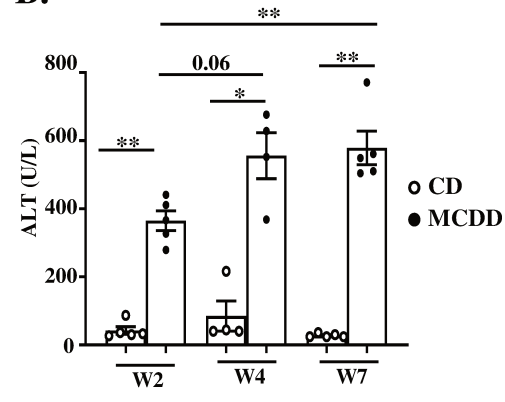
- [74] Verdam FJ, Rensen SS, Driessen A, Greve JW, Buurman WA. Novel evidence for chronic exposure to endotoxin in human nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2011;45:149-152.
- [75] Luck H, Tsai S, Chung J, Clemente-Casares X, Ghazarian M, Revelo XS, et al. Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents. *Cell Metab* 2015;21:527-542.
- [76] Schroeder BO, Birchenough GMH, Stahlman M, Arike L, Johansson MEV, Hansson GC, et al. Bifidobacteria or Fiber Protects against Diet-Induced Microbiota-Mediated Colonic Mucus Deterioration. *Cell Host Microbe* 2018;23:27-40 e27.
- [77] Fuchs A, Vermi W, Lee JS, Lonardi S, Gilfillan S, Newberry RD, et al. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-gamma-producing cells. *Immunity* 2013;38:769-781.
- [78] Klose CSN, Flach M, Mohle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K, et al. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* 2014;157:340-356.
- [79] Tang L, Peng H, Zhou J, Chen Y, Wei H, Sun R, et al. Differential phenotypic and functional properties of liver-resident NK cells and mucosal ILC1s. *J Autoimmun* 2016;67:29-35.
- [80] Yang L, Zhang Y, Wang L, Fan F, Zhu L, Li Z, et al. Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22. *J Hepatol* 2010;53:339-347.
- [81] Wang X, Ota N, Manzanillo P, Kates L, Zavala-Solorio J, Eidenschenk C, et al. Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature* 2014;514:237-241.
- [82] Hamaguchi M, Okamura T, Fukuda T, Nishida K, Yoshimura Y, Hashimoto Y, et al. Group 3 Innate Lymphoid Cells Protect Steatohepatitis From High-Fat Diet Induced Toxicity. *Front Immunol* 2021;12:648754.

FIGURE 1

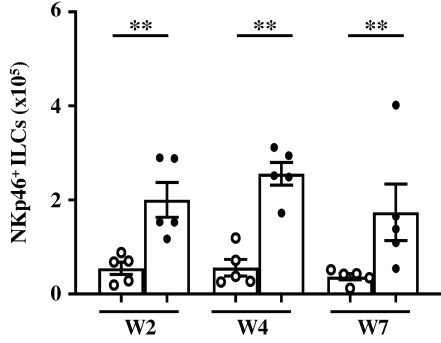
A.



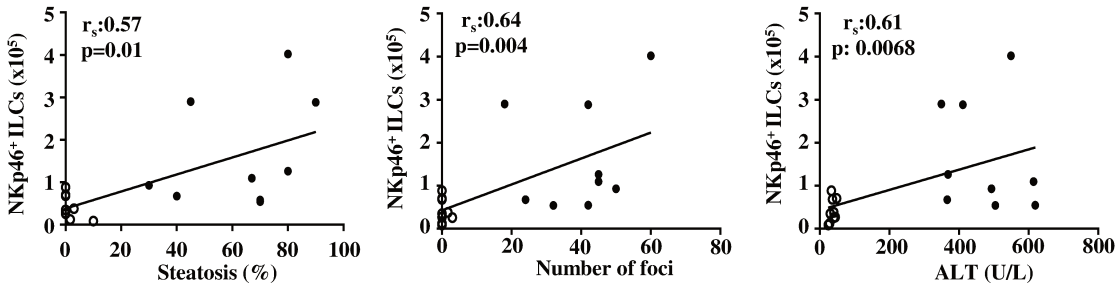
B.



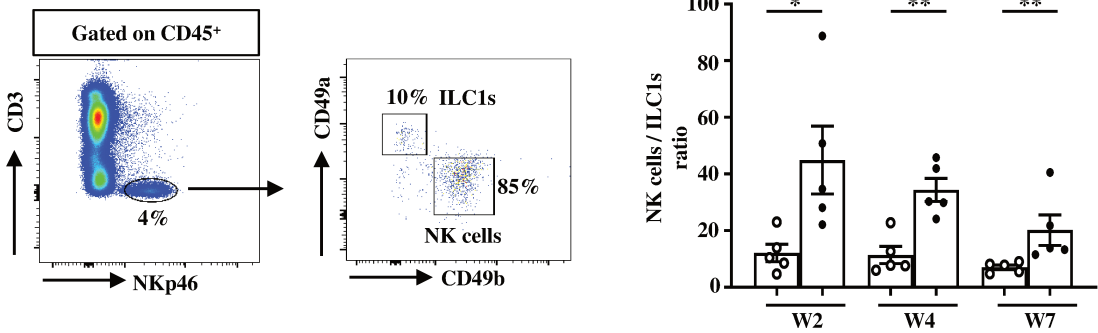
C.



D.



E.



F.

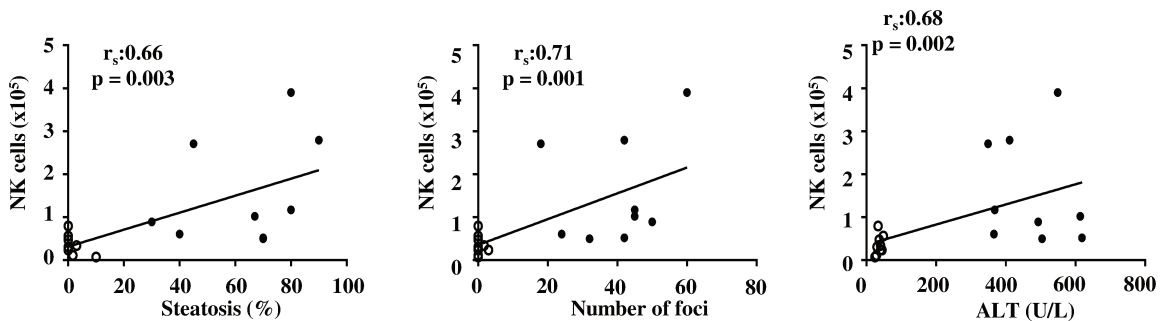
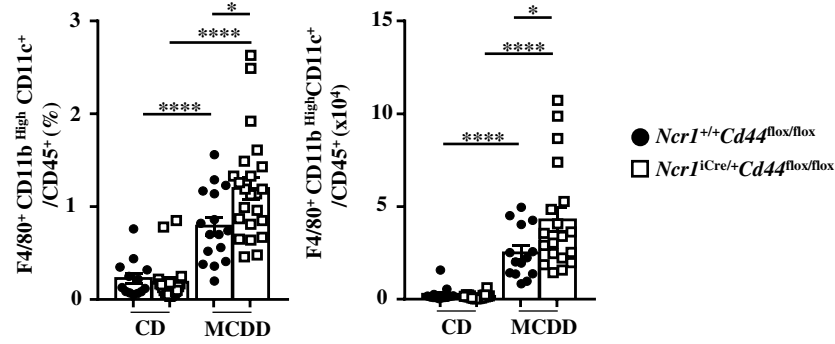
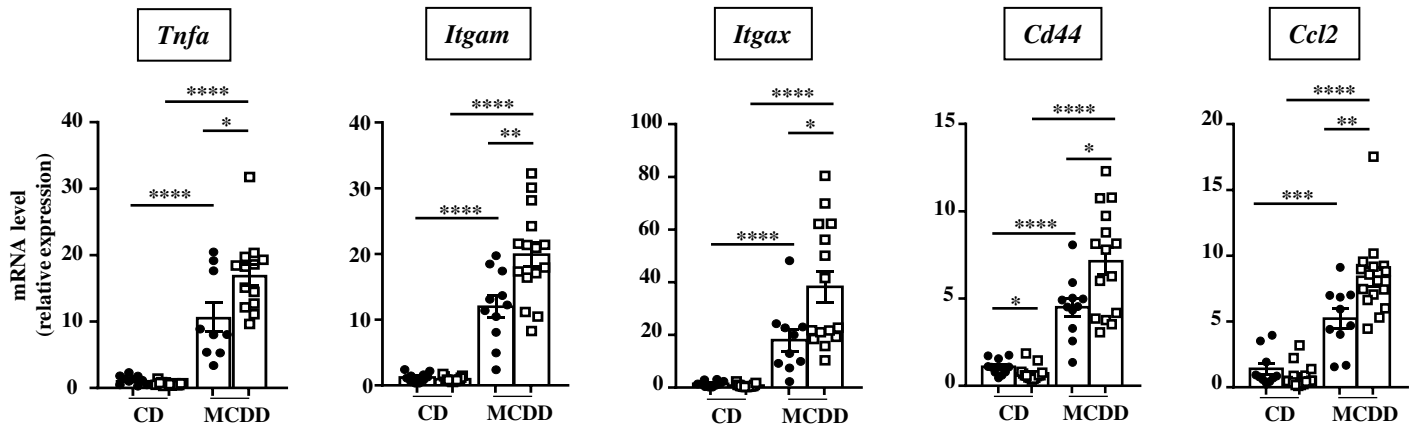


FIGURE 3

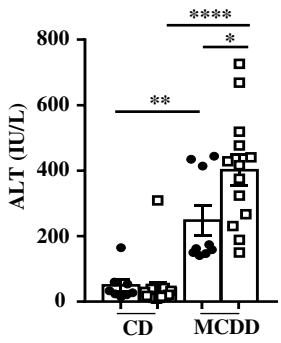
A.



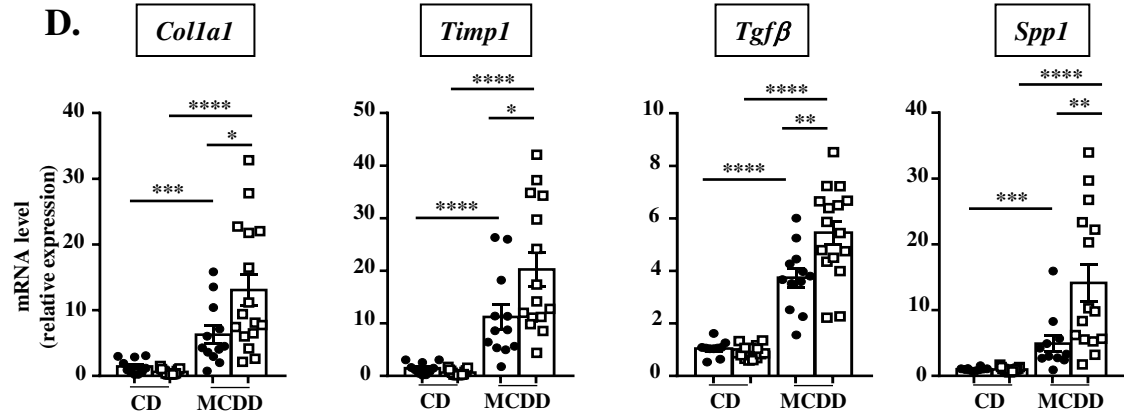
B.



C.



D.



E.

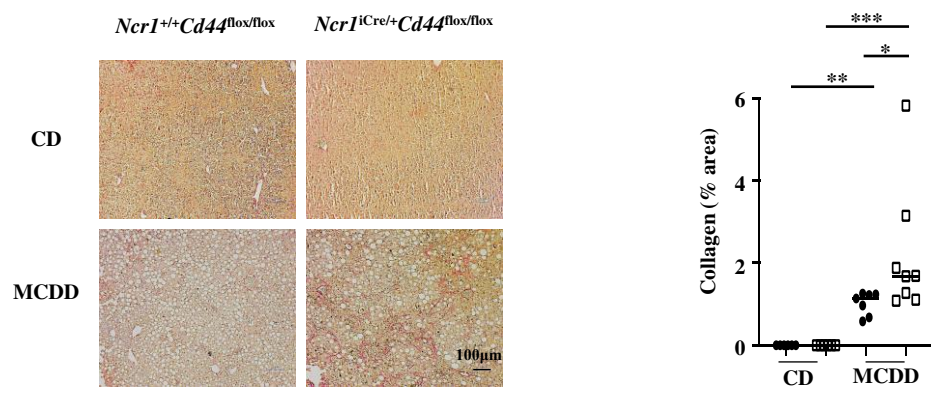


FIGURE 4

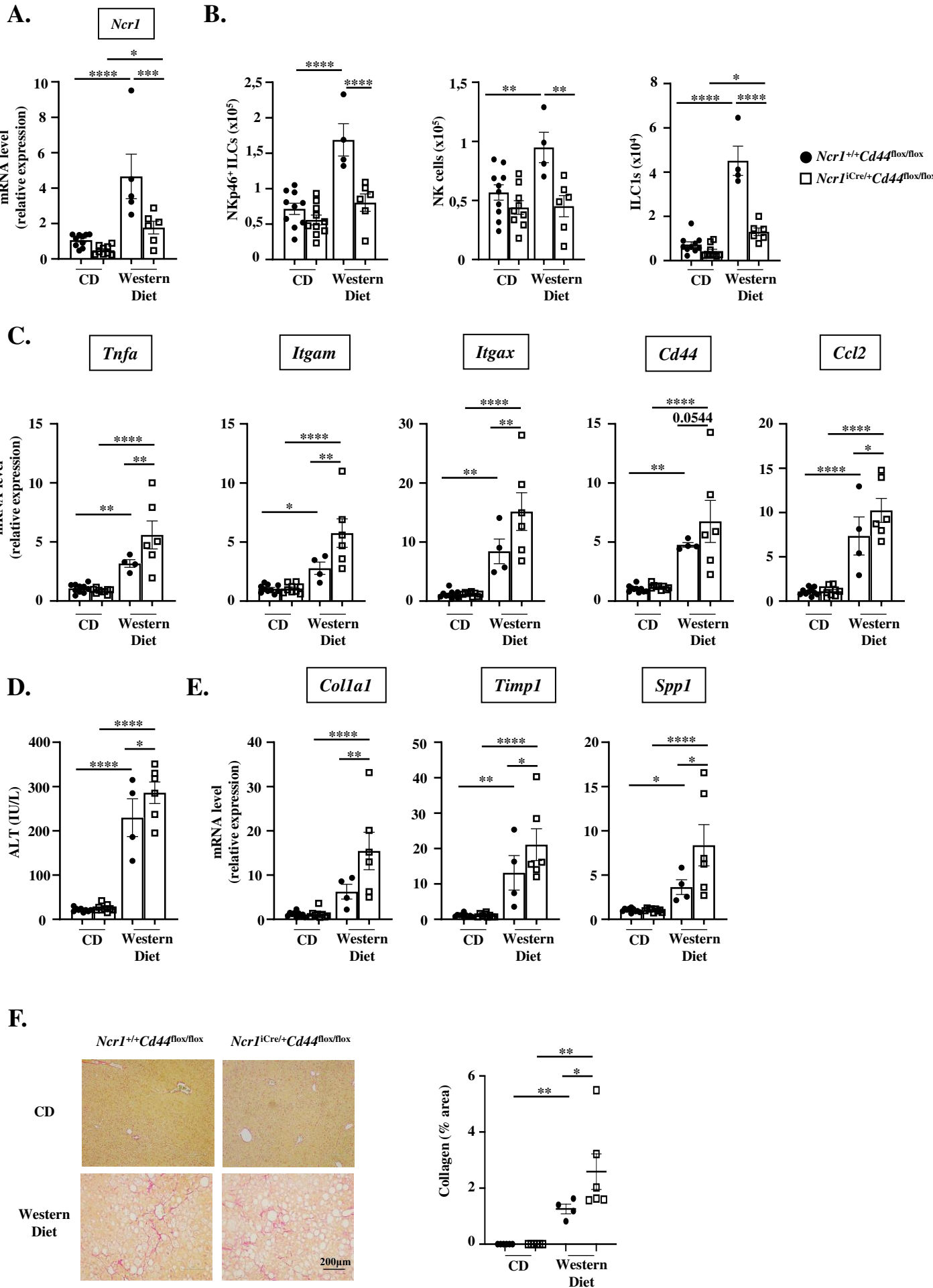
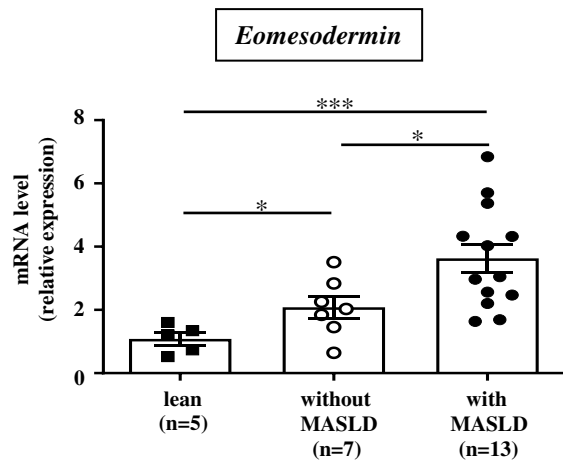
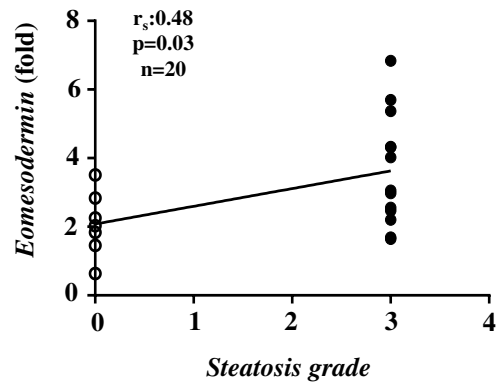


FIGURE 5

A.



B.



C.

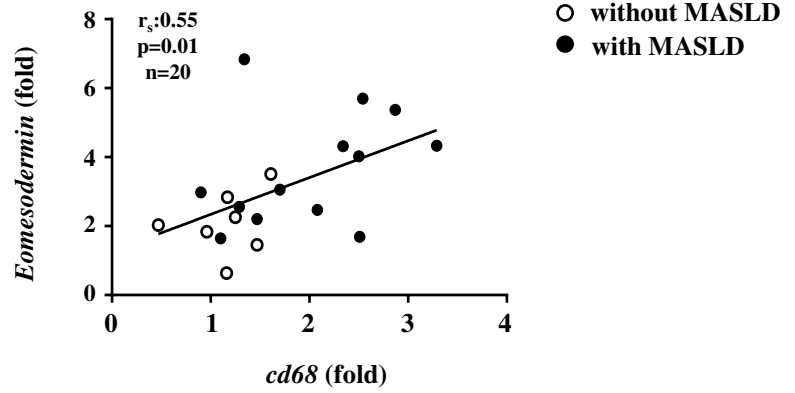
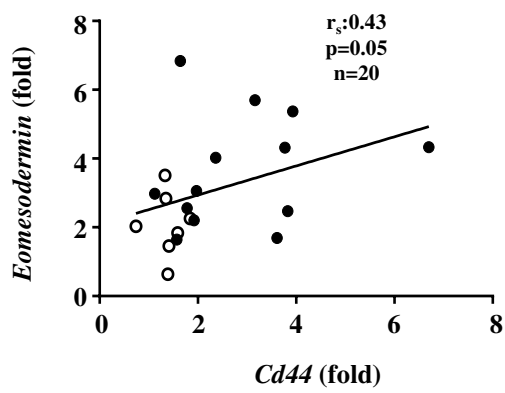


FIGURE 6

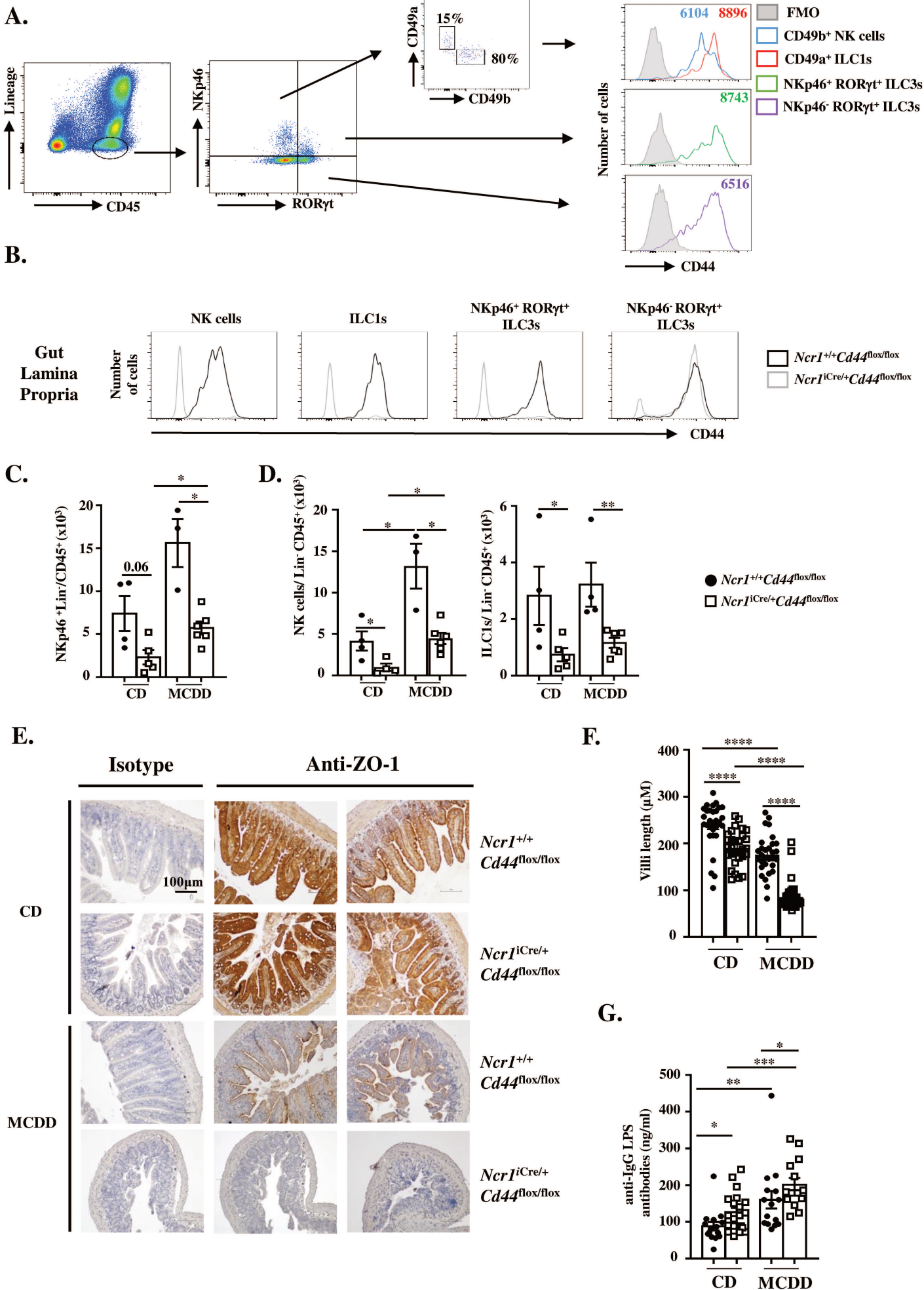


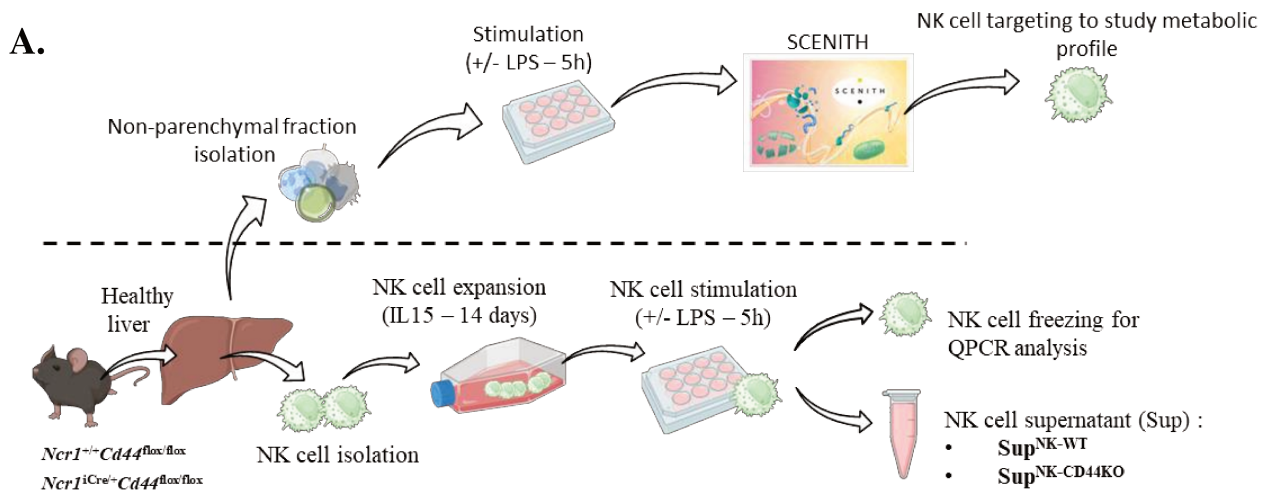
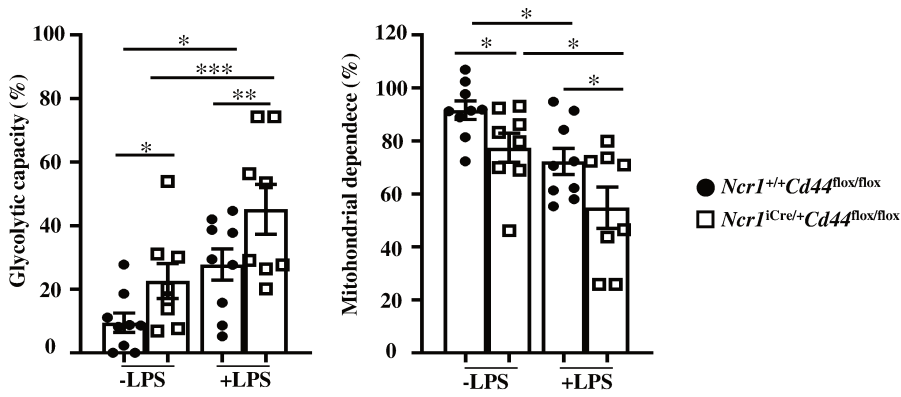
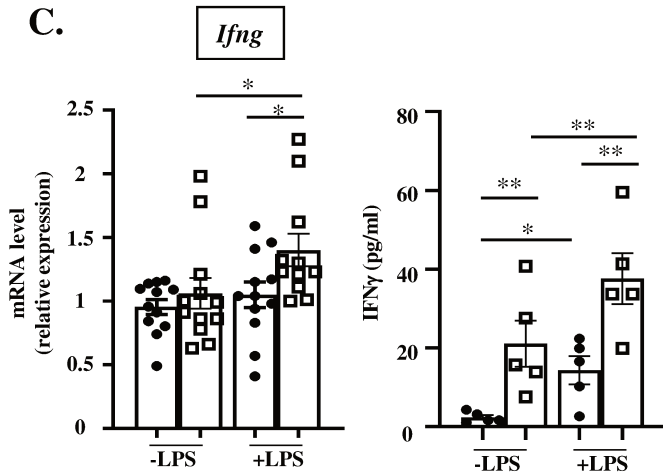
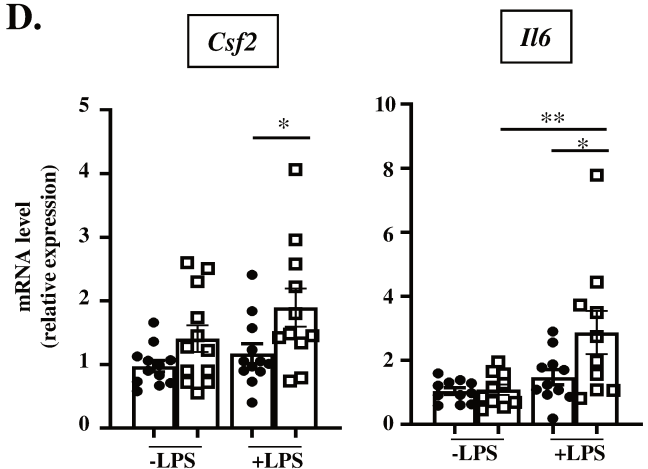
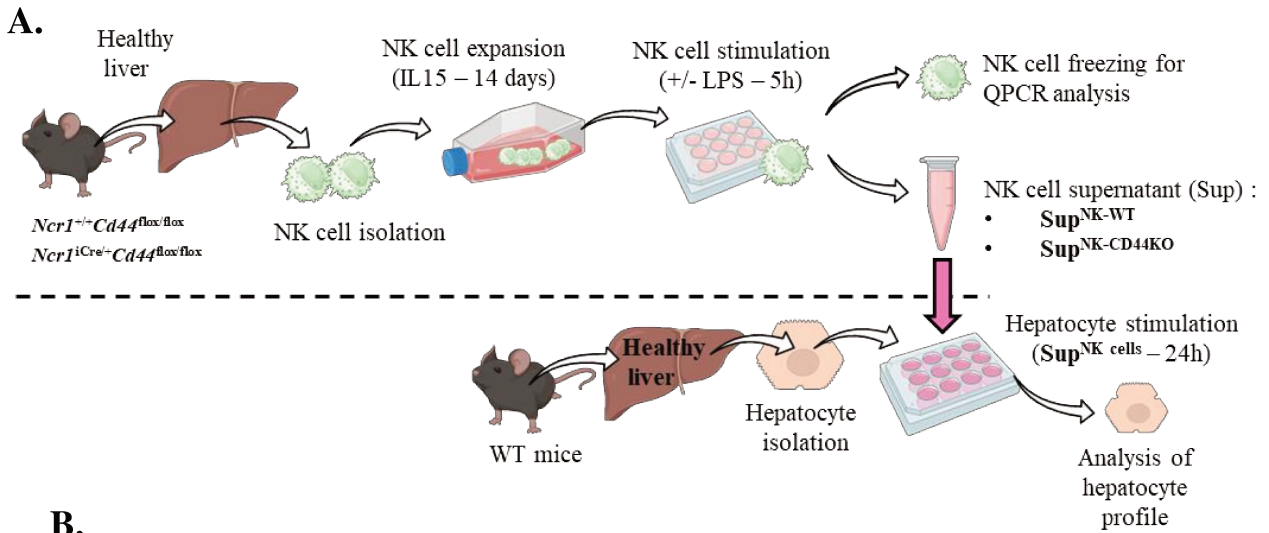
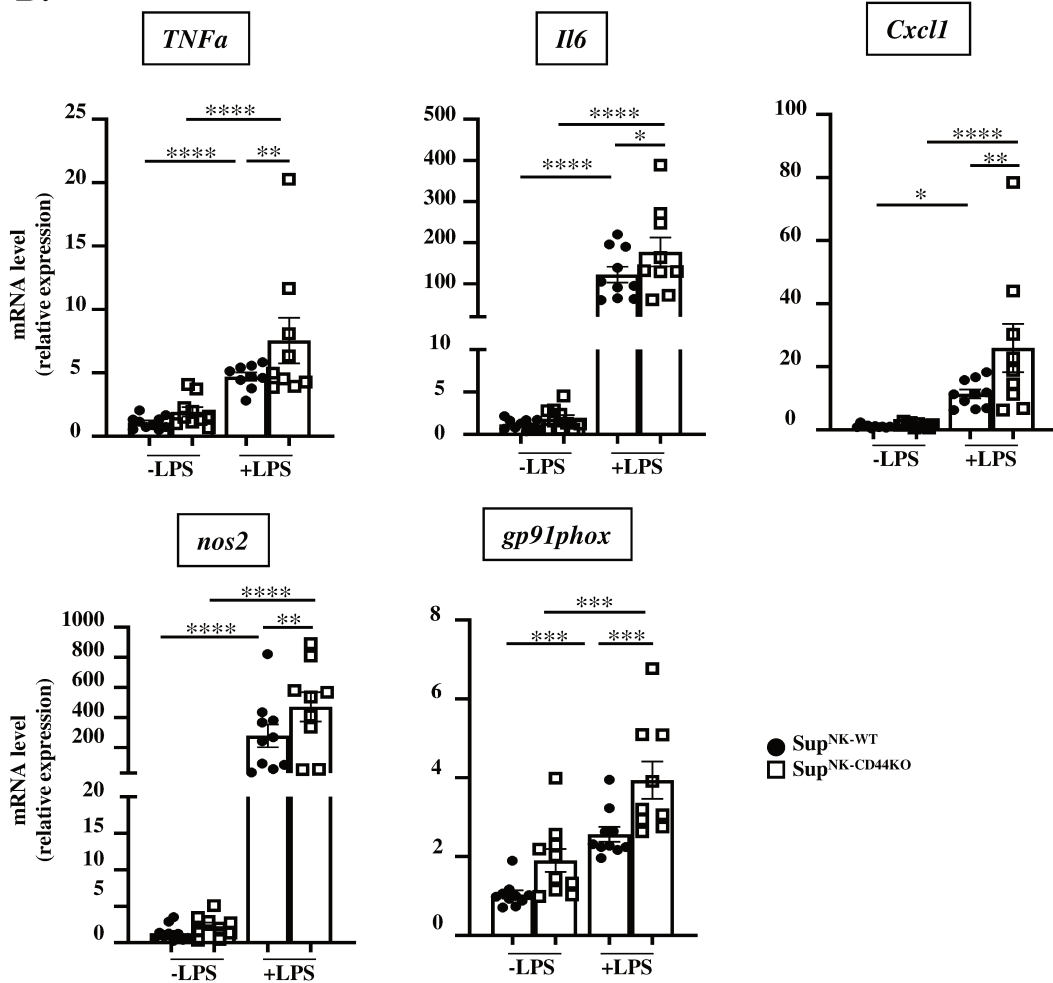
FIGURE 7**B.****C.****D.**

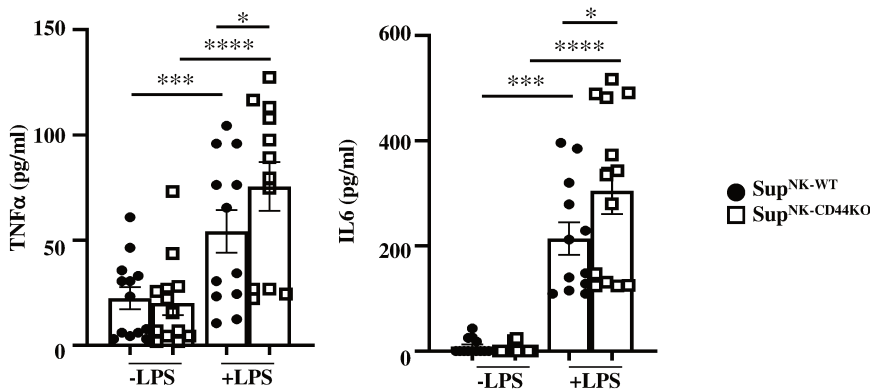
FIGURE 8



B.

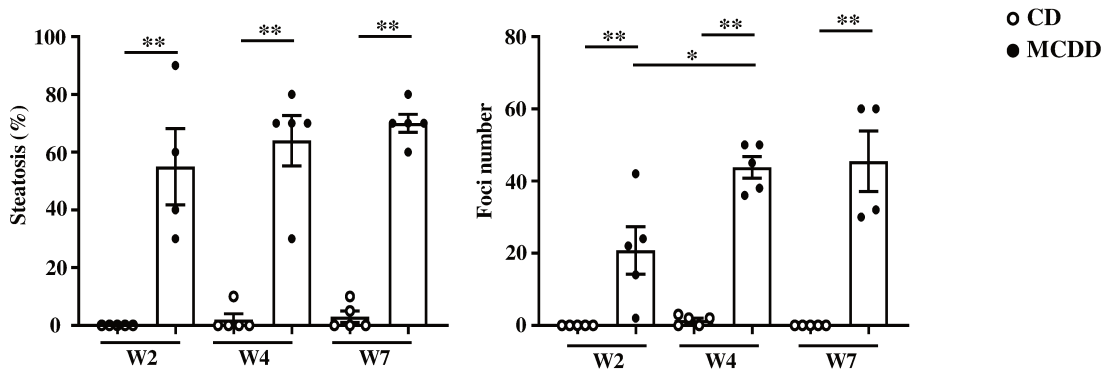


C.

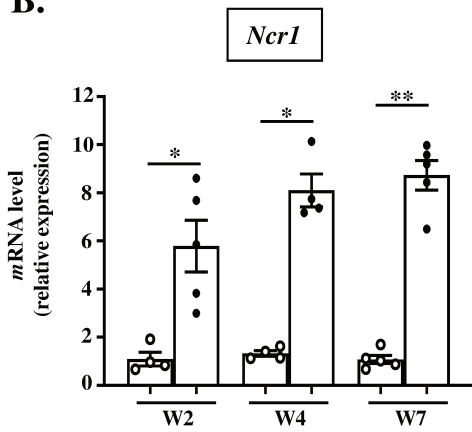


Supplementary figure 1

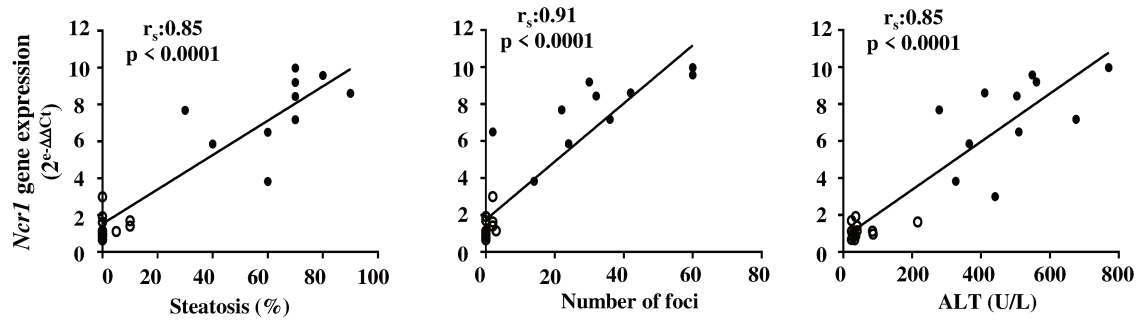
A.



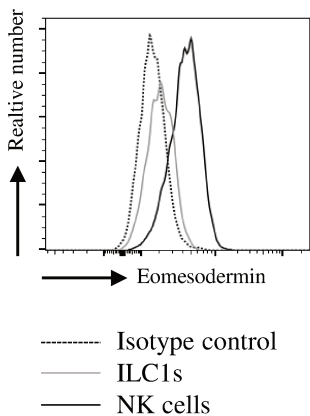
B.



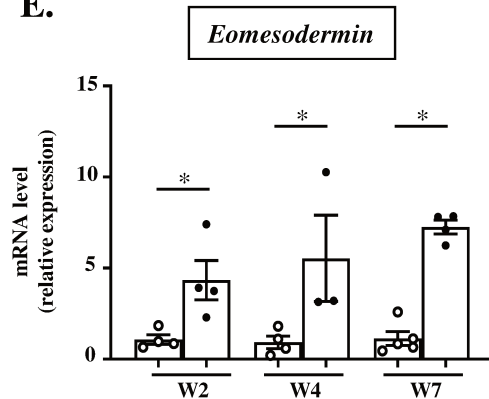
C.



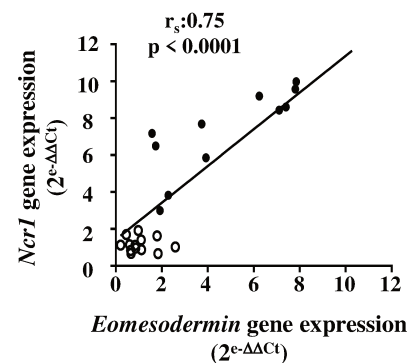
D.



E.

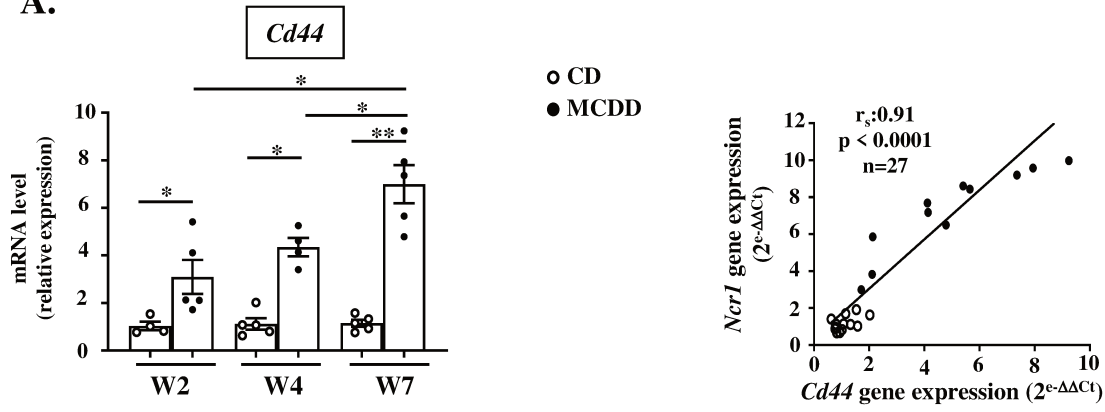


F.

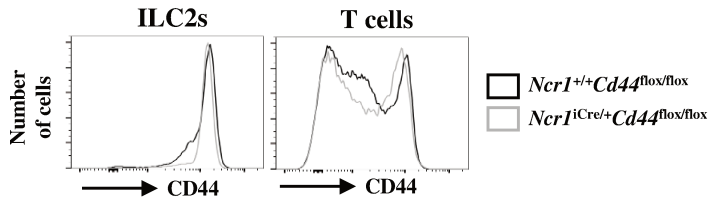


Supplementary figure 2

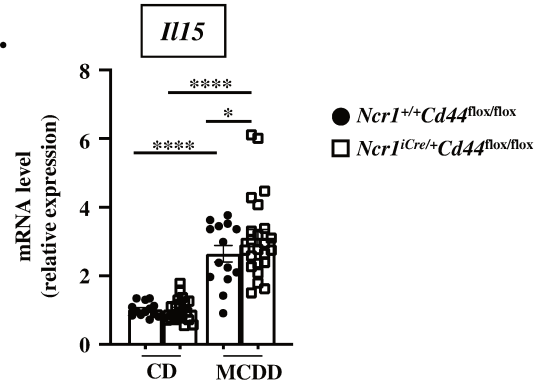
A.



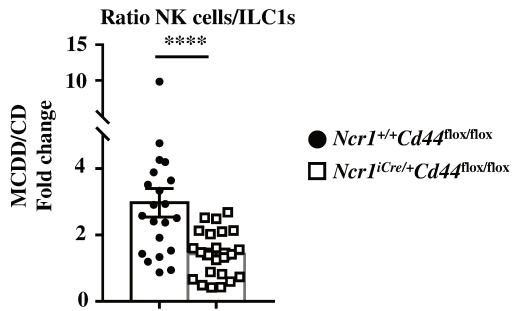
B.



C.

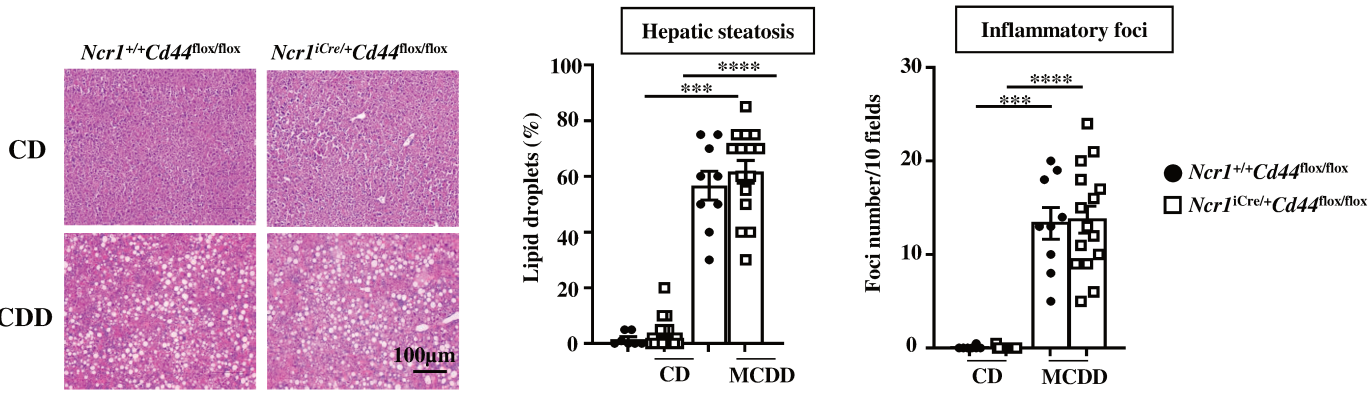


D.

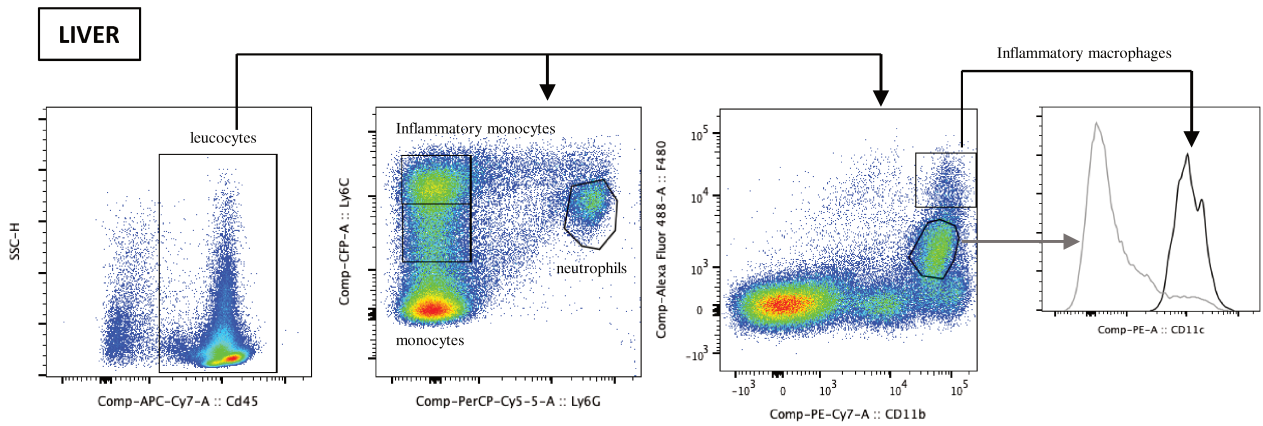


Supplementary figure 3

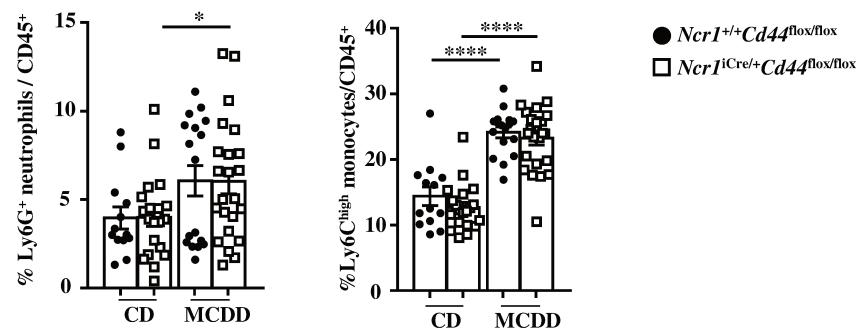
A.



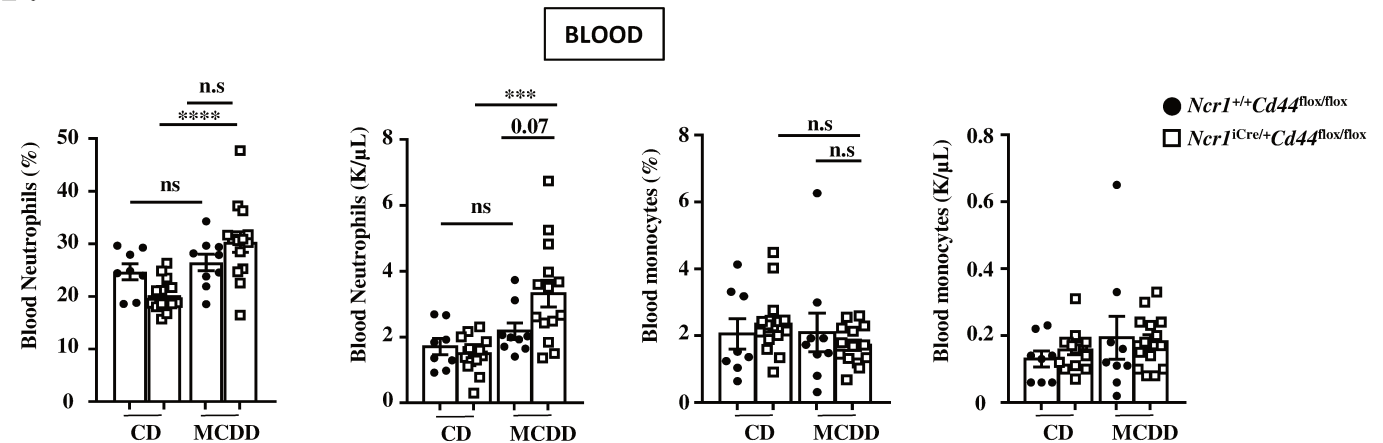
B.



C.

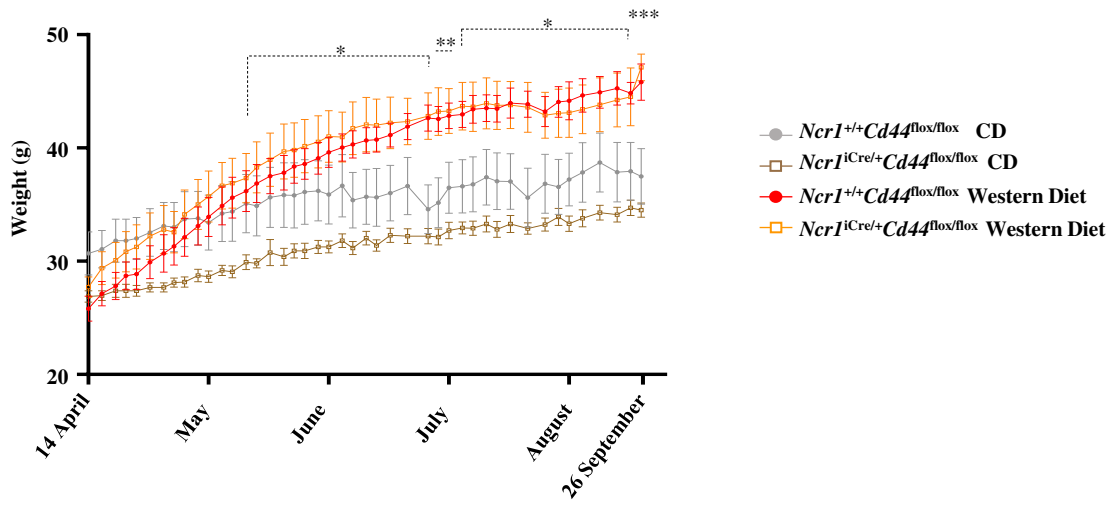


D.

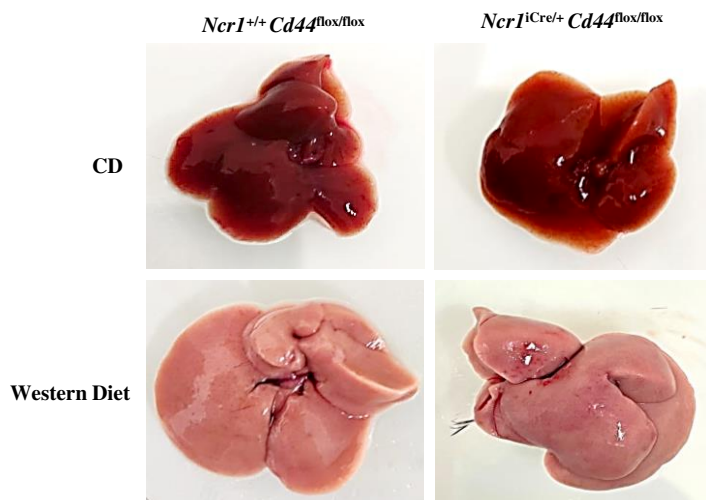


Supplementary figure 4

A.

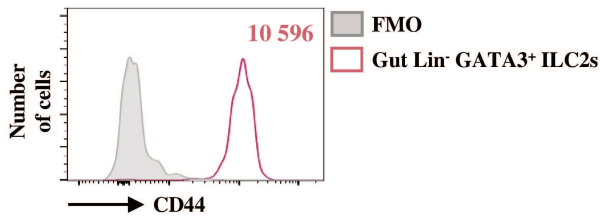


B.



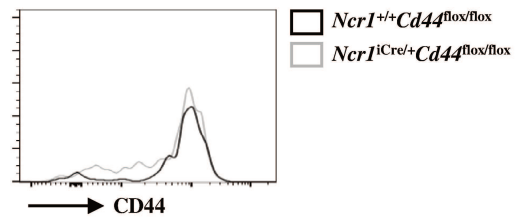
Supplementary figure 5

A.

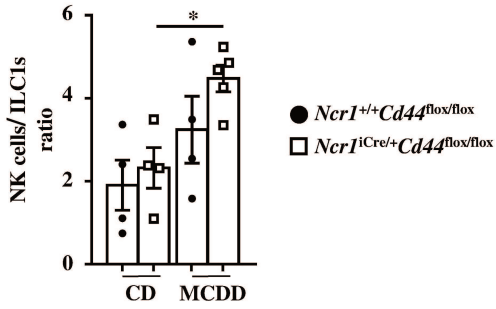


B.

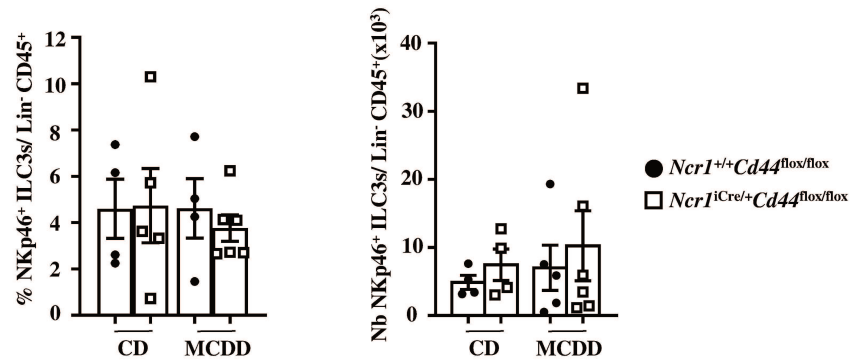
Gut Lin⁻ NKp46⁺GATA3⁺ ILC2s



C.

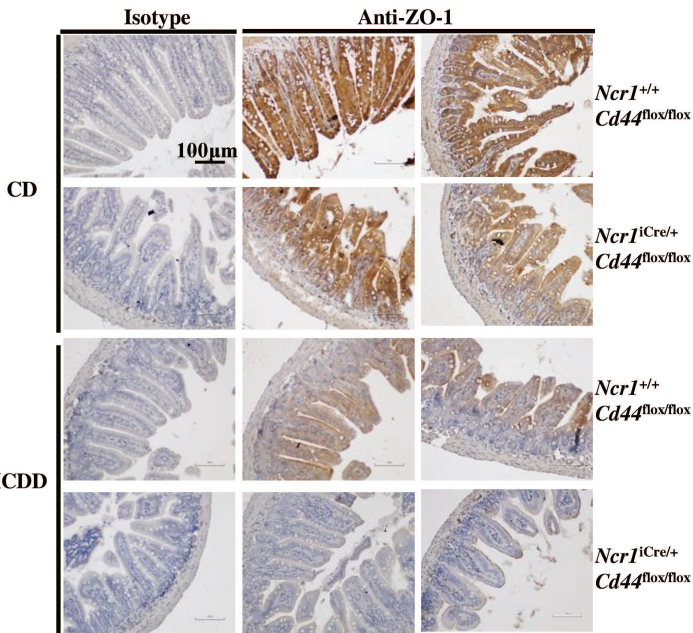


D.



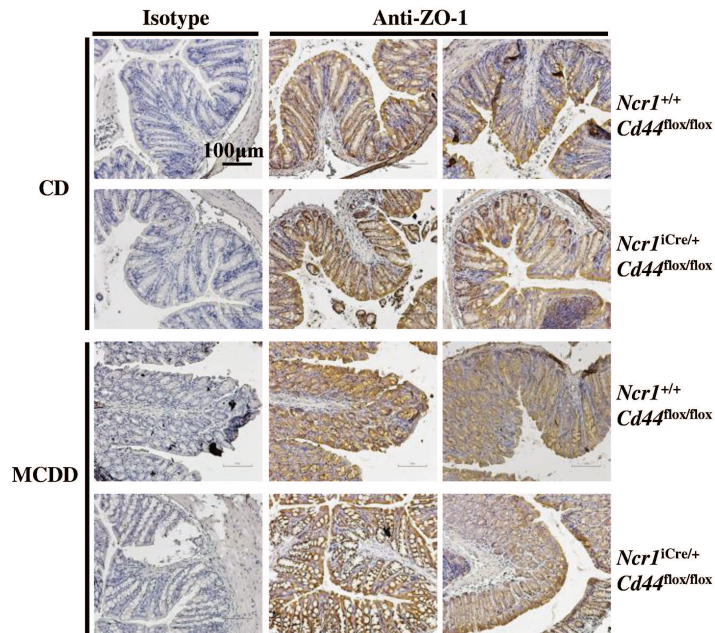
E.

Ileum
2w



F.

Colon
4w



RESULTATS PARTIE II

1- Métabolisme et fonctions effectrices des cellules NK invalidées pour CD44

Dans la première partie de nos résultats, l'aggravation des complications hépatiques chez les souris *Ncr1^{iCre/+}CD44^{flx/flx}* nourries avec des régimes inducteurs de MASH, nous a poussé à nous interroger sur le fait que l'invalidation spécifique de CD44 au sein des ILC NKp46⁺ pouvait déréguler les propriétés des cellules NK. CD44 serait donc possiblement un nouveau régulateur des fonctions des cellules NK en influençant notamment leur métabolisme. Afin d'étudier le possible lien de CD44 avec le métabolisme et les fonctions effectrices des cellules NK hépatiques, nous avons tout d'abord activé les cellules NK par les deux moyens les plus communément utilisés : la stimulation cytokinique (IL-12/IL-18) et l'activation du récepteur activateur NK1.1 (anticorps anti-NK1.1).

Les cellules NK invalidées pour CD44 et activées par un anticorps anti-NK1.1 présentent une augmentation de la glycolyse et de leur capacité glycolytique par rapport aux cellules NK de souris contrôles (Figure 18A et B).

Les cellules NK hépatiques de souris « littermate » (contrôles) stimulées avec de l'IL-12/IL-18 présentent une augmentation de la glycolyse et de leur capacité glycolytique comparée aux cellules NK non stimulées. Cependant, les niveaux de glycolyse et de capacité glycolytique des cellules NK hépatiques invalidées pour CD44 sont significativement réduits par rapport à ceux des cellules NK contrôles. De plus, les cellules NK hépatiques de souris contrôles stimulées avec de l'IL-12/IL-18 présentent bien une augmentation de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) comparée aux cellules NK non stimulées. Cependant, à l'inverse des résultats obtenus pour la glycolyse, les cellules NK hépatiques invalidées pour CD44 et stimulées avec de l'IL-12/IL-18 possèdent une capacité respiratoire maximale mitochondriale plus importantes que les cellules NK contrôles. Ainsi les cellules NK invalidées pour CD44 après une stimulation IL-12/IL-18 semblent favoriser plus l'OXPHOS que la glycolyse, ce qui laisse penser qu'elles ont un niveau d'activation moins important.

De manière intéressante, les cellules NK hépatiques contrôles activées par un anticorps anti-NK1.1, ne présentent pas des niveaux de glycolyse et de capacité glycolytique augmentés par rapport aux cellules NK non stimulées. En revanche, les cellules NK hépatiques invalidées pour CD44 présentent une glycolyse et une capacité glycolytique augmentées par rapport aux cellules NK non stimulées et aux cellules NK contrôles activées. En ce qui concerne la

phosphorylation oxydative, nous avons constaté qu'après une activation des cellules NK par stimulation du récepteur NK1.1, celle-ci n'est pas modifiée et reste au même niveau que l'OXPPOS des cellules NK contrôles. De plus, nous avons constaté que les cellules NK invalidées pour CD44 et activées par l'anticorps anti-NK1.1 présentaient une réduction significative de leur capacité respiratoire mitochondriale maximale par rapport aux cellules NK contrôles activées. Ainsi, les cellules NK invalidées pour CD44 et activées par stimulation du récepteur NK1.1 semblent favoriser la voie glycolytique au dépend de l'OXPPOS.

Nous avons donc constaté que les cellules NK invalidées pour CD44 et activées par une stimulation du récepteur activateur NK1.1, présentent des résultats opposés à ceux obtenus avec la stimulation IL-12/IL-18, puisqu'elles présentent une augmentation de la glycolyse (au dépend de l'OXPPOS) et donc possiblement de leurs fonctions effectrices.

L'expression des gènes du métabolisme par les cellules NK invalidées pour CD44 est diminuée après activation avec un anticorps anti-NK1.1 (Figure 18C et D).

Afin d'aller plus loin dans l'analyse du métabolisme, nous nous sommes donc intéressés aux différents régulateurs clés du métabolisme : mTOR, cMyc et Slc7a5. Pour cela, nous avons évalué leur expression génique après stimulation des cellules NK contrôles ou invalidées pour CD44 avec de l'IL-12/IL-18 ou l'utilisation d'un anticorps anti-NK1.1.

Dans un premier temps, nous avons constaté que les niveaux d'expression génique de *mTOR* étaient quasiment équivalents à ceux des contrôles après stimulation par les cytokines IL-12/IL-18 ou après activation du récepteur NK1.1 que ce soit pour les cellules NK contrôles ou invalidées spécifiquement pour CD44. Étant donné que nous sommes sur des temps prolongés de stimulation et que mTOR est le premier régulateur du métabolisme, les niveaux d'expression se sont alors potentiellement affaiblis pour laisser le relais aux autres acteurs clés : cMyc et le transporteur aux nutriments Slc7a5. En effet, nous avons pu constater que les niveaux d'expression de *Myc* et *Slc7a5* sont bien augmentés après une stimulation cytokinique IL-12/IL-18 ou après l'utilisation d'un anticorps anti-NK1.1 chez les cellules NK contrôles et invalidées pour CD44. Cependant, bien que la glycolyse et la capacité glycolytique des cellules NK contrôles stimulées IL-12/IL-18 soit augmentées par rapport aux cellules NK invalidées pour CD44, les niveaux d'expression génique de *Myc* et *Slc7a5* sont identiques pour les deux groupes. De plus, après activation des cellules NK invalidées pour CD44 avec anticorps anti-NK1.1, les niveaux d'expression génique de *Myc* et *Slc7a5* sont significativement diminués, comparés aux niveaux d'expression des cellules NK contrôles également activées. Par ailleurs,

l'expression protéique du récepteur à la transferrine CD71 (gène cible de cMyc) est également diminuée chez les souris NK invalidées pour CD44 après stimulation du récepteur NK1.1, comparée aux cellules NK contrôles. Ces résultats sont surprenant puisque les cellules NK invalidées pour CD44 et activées via NK1.1 présentent une glycolyse et une capacité glycolytique augmentées par rapport aux souris contrôles. Ainsi cMyc et Slc7a5 ne semblent pas associés à l'augmentation de la glycolyse des cellules NK invalidées pour CD44.

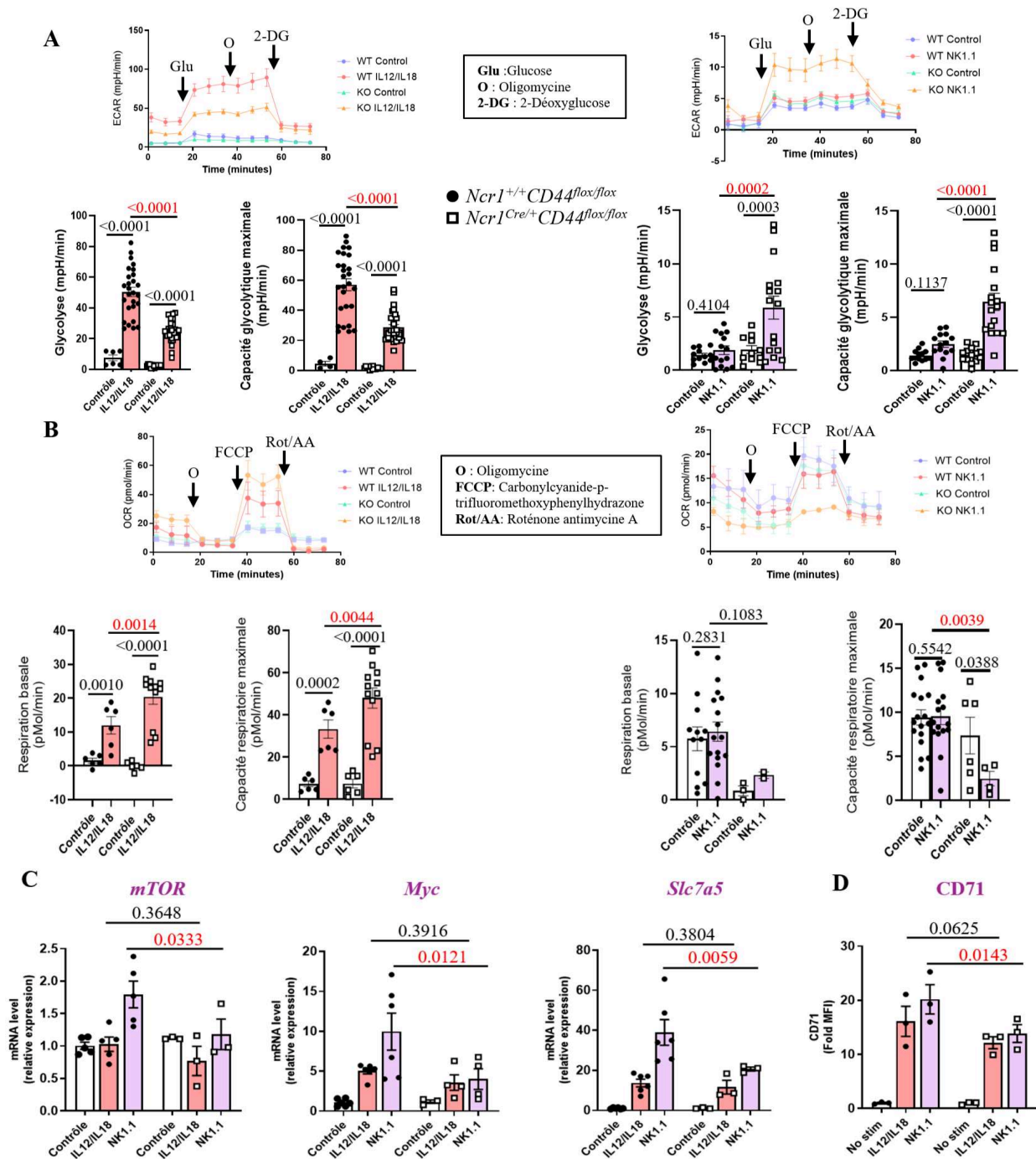


Figure 1. Métabolisme des cellules NK hépatiques isolées de souris Littermate ou invalidées spécifiquement pour CD44, après stimulation cytokinique ou activation du récepteur NK1.1.

Les cellules NK hépatiques ont été isolées par sélection négatives magnétiques et mises en expansion pendant 10 jours en présence IL15.

Mesure du taux d'acidification extracellulaire (ECAR) (A) et du taux de consommation d'oxygène (OCR) (B) des cellules NK hépatiques après stimulation IL12/IL18 ou activation du récepteur activateur NK1.1 par l'analyseur Agilent Seahorse (n=2 à 4 souris/groupe et Seahorse réalisé en triplicat). (C) Niveaux d'expression de l'ARNm des régulateurs clés du métabolisme (*mTOR*, *Myc*, *Slc7a5*) des cellules NK activées (IL12/IL18 ou NK1.1) (n=3 à 5 souris/groupe). Toutes les données de PCR quantitative en temps réel sont présentées comme des niveaux d'expression relative de l'ARNm normalisés par rapport à l'ARNm *b2m*. (D) Expression du récepteur à la transferrine CD71 (gène cible de cMyc) par les cellules NK invalidées ou non pour CD44 et activées (IL12/IL18 ou NK1.1) (n=3 souris/ groupe) ; données obtenues par cytométrie en flux.

Analyse statistique : two-way ANOVA.

La fonction cytokinique des cellules NK invalidées pour CD44 et activées avec un anticorps anti-NK1.1 est diminuée tandis que l'activité cytotoxique est augmentée (Figure 19).

Afin d'établir un lien entre le métabolisme et les fonctions effectrices des cellules NK invalidées pour CD44, nous avons alors étudié la réponse cytokinique (IFN γ , TNF α , GM-CSF...) et cytotoxique (Granzyme B et CD107a) de ces cellules.

Les cellules NK contrôles et invalidées pour CD44 stimulées avec de l'IL-12/IL-18 ne présentent aucune différence au niveau de l'expression des gènes de l'*Ifn γ* et du *Tnf α* , ni au niveau de la production des cytokines inflammatoires (IFN γ , TNF α , GM-CSF) et du Granzyme B. Ces résultats concordent avec ceux obtenus au niveau de l'expression génique des marqueurs du métabolisme *Myc*, *Slc7a5*.

De manière intéressante, les cellules NK invalidées pour CD44 et activées par le récepteur NK1.1 voient leur fonction cytokinique diminuée, que ce soit au niveau des gènes de l'*Ifn γ* et du *Tnf α* ou au niveau protéique avec une diminution de la production d'IFN γ , de TNF α et de GM-CSF. Cependant, la fonction cytotoxique, et plus particulièrement la sécrétion de Granzyme B, des cellules NK invalidées pour CD44 après stimulation du récepteur NK1.1 est significativement augmentée par rapport aux cellules NK contrôles. Ces résultats obtenus ont également été validés après étude des fonctions effectrices des cellules NK stimulées avec un anticorps anti-NK1.1 par cytométrie en flux, puisqu'une diminution de la production d'IFN γ a été observée chez les cellules NK invalidées pour CD44 alors qu'une augmentation de leur capacité de dégranulation a significativement augmenté. Ainsi l'augmentation de la glycolyse, observée chez les cellules NK invalidées pour CD44 et activées par le récepteur NK1.1, pourrait être associée à l'augmentation de la sécrétion de Granzyme B et de la capacité de dégranulation d'une manière indépendante de cMyc et Slc7a5.

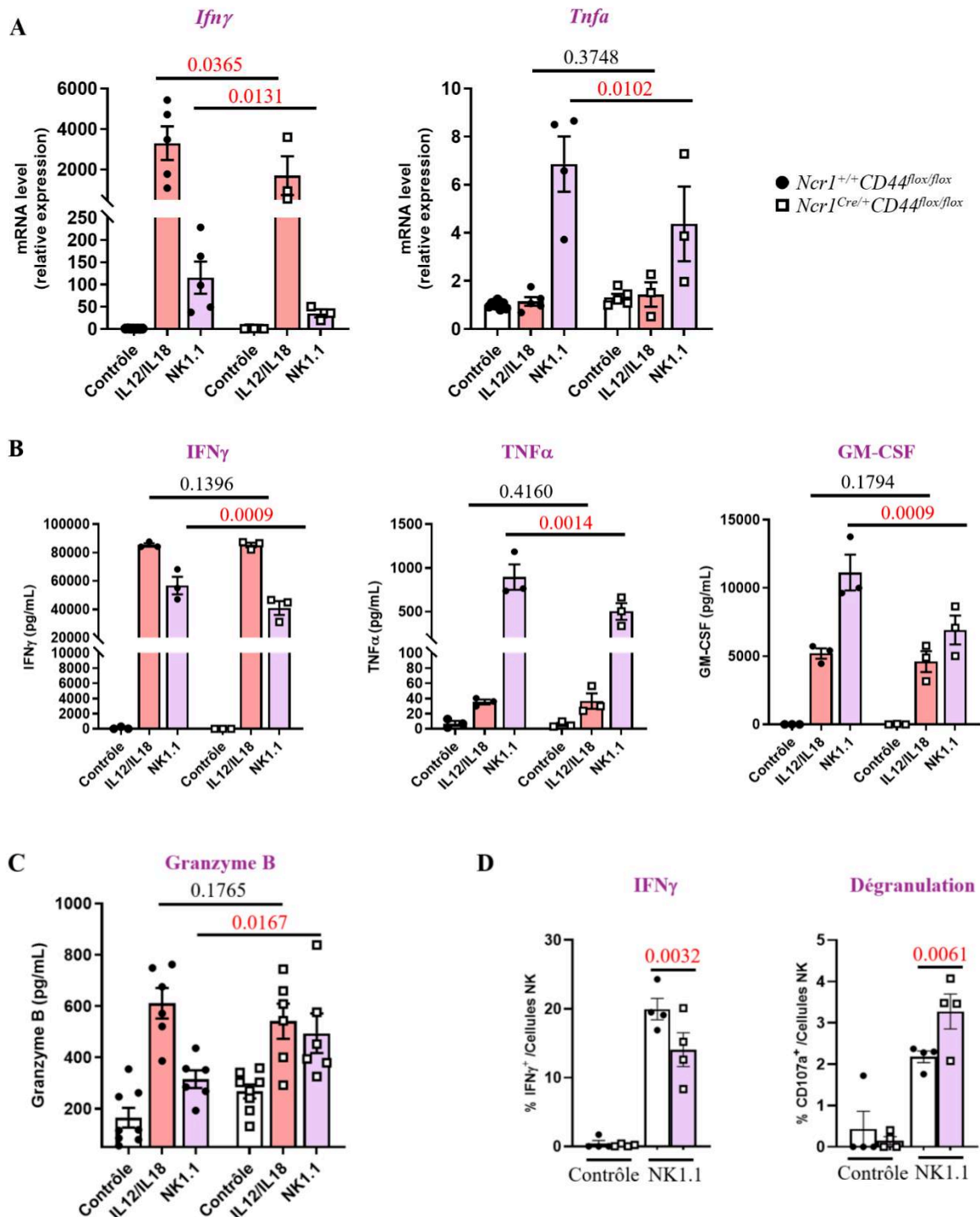


Figure 19. Etude des fonctions effectrices des cellules NK hépatiques isolées de souris littermate ou invalidées spécifiquement pour CD44, après stimulation cytokinique (IL12/IL18) ou activation du récepteur NK1.1.

(A) Niveaux d'expression de l'ARNm des cytokines pro-inflammatoires (*Ifng* et *Tnfa*) des cellules NK activées (IL12/IL18 ou NK1.1) (n=3 à 5 souris/groupe). Toutes les données de PCR quantitative en temps réel sont présentées comme des niveaux d'expression relative de l'ARNm normalisés par rapport à l'ARNm *b2m*. (B) Taux de cytokines inflammatoires (IFN γ , TNF α , GM-CSF) sécrétées par les cellules NK activées (IL12/IL18 ou NK1.1) (n=3 souris/groupe). (C) Taux de Granzymes B libérés par les cellules NK activées (IL12/IL18 ou NK1.1) (n=6 à 8 souris/groupe). (D) Etude des fonctions effectrices des cellules NK activée par un anticorps anti-NK1.1 par cytométrie en flux.

Analyse statistique : two-way ANOVA.

La production d'IFN γ par les cellules NK de souris invalidées spécifiquement pour CD44 est augmentée tandis que leur capacité cytotoxique est inchangée après 4 semaines de régime MCDD (Figure 20A-20C).

Afin de déterminer le rôle des cellules NK dans un contexte de MASH nous avons évalué le métabolisme de ces cellules, leur quantité d'IFN γ et leur capacité de dégranulation (reflet de la sécrétion de granzyme B) après 4 semaines de régime MCDD. Par ailleurs, nous avons également dosé dans le foie total de nos souris les niveaux protéiques d'IFN γ et de granzyme B.

L'étude du métabolisme des cellules NK des souris nourries sous MCDD durant 4 semaines ont permis de mettre en évidence une augmentation de la capacité glycolytique des cellules NK invalidées pour CD44 par rapport aux cellules NK de souris contrôles. Ainsi dans un contexte de MASH, les cellules NK invalidées pour CD44 sont métaboliquement plus actives.

Ensuite, nous avons constaté que la quantité d'IFN γ au niveau hépatique est significativement augmentée chez nos souris invalidées spécifiquement pour CD44 par rapport à notre groupe de souris contrôles après 4 semaines de MCDD. Même si d'autres cellules immunitaires produisent de l'IFN γ , les cellules NK représentent une source indéniable de cette cytokine dans les maladies du foie liées à l'obésité. De plus, nous avons constaté que les cellules NK provenant des souris invalidées pour CD44 présentaient une sécrétion d'IFN γ plus importante que les souris contrôles après 4 semaines de MCDD.

Par la suite, le dosage du Granzyme B dans le foie totale de nos souris a révélé une diminution de sa sécrétion chez nos souris invalidées spécifiquement pour CD44 par rapport à nos souris contrôles sous MCDD. Par ailleurs, l'étude de la cytotoxicité (CD107a) des cellules NK hépatiques des souris invalidées pour CD44 sous MCDD n'a révélé aucune différence au niveau du pourcentage de cellules NK ayant dégranulé par rapport aux souris contrôles.

Ainsi, les cellules NK invalidées pour CD44 dans un contexte de stéatohépatite présentent un shift métabolique en faveur de la glycolyse (diminution de la dépendance mitochondriale). Leur capacité glycolytique est par ailleurs significativement augmentée par rapport aux cellules NK de souris contrôle. L'étude de leurs fonctions effectrices au cours de la MASH a révélé une

augmentation de leur fonction cytokinique (augmentation de production d'IFN γ) mais aucune modification de leur fonction cytotoxique.

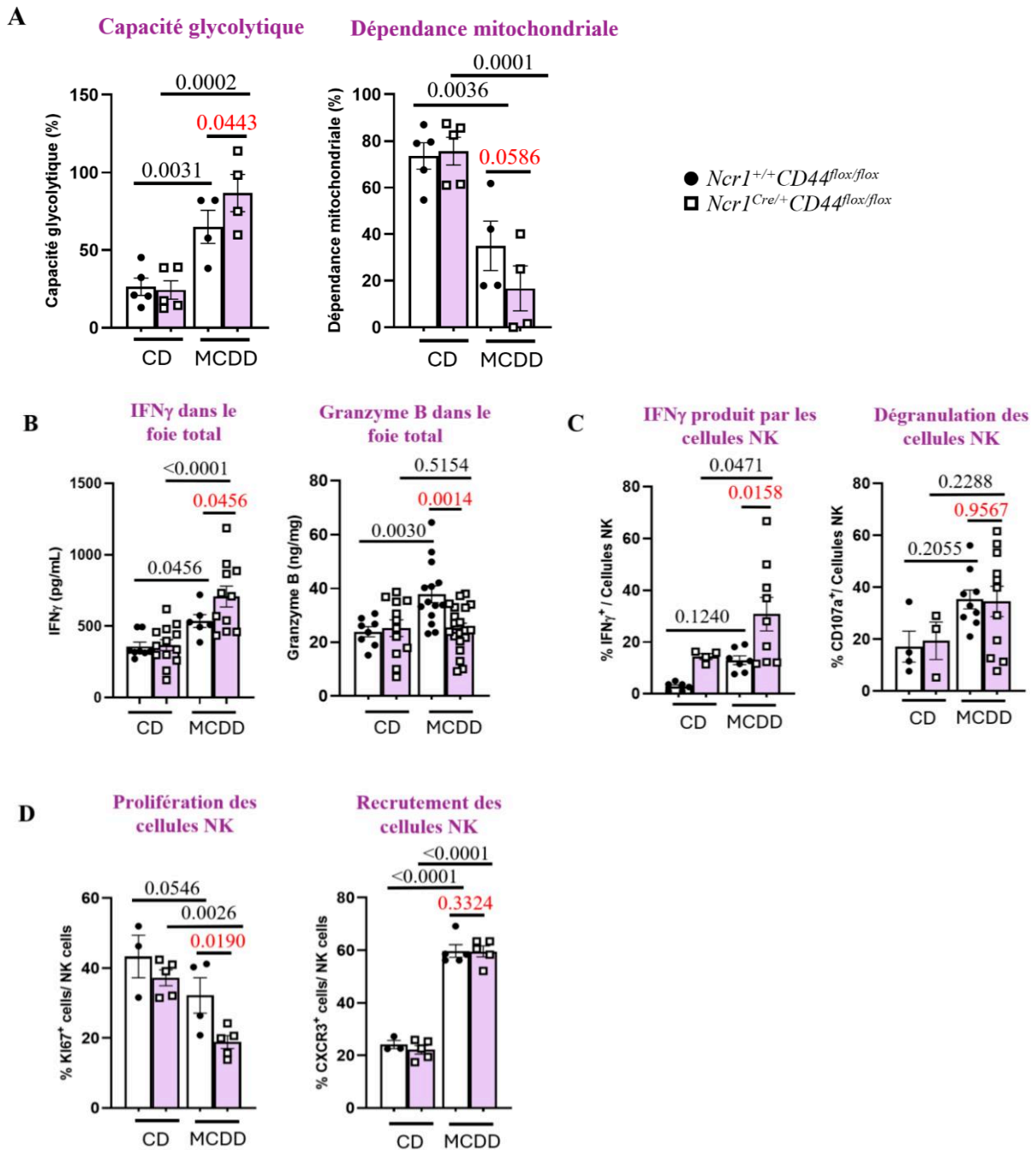


Figure 20. Etude du métabolisme, des fonctions effectrices, de la capacité de prolifération et de recrutement des cellules NK invalidées ou non pour CD44 après 4 semaines de MCDD

(A) Capacité glycolytique et dépendance mitochondriale des cellules NK après 4 semaines de MCDD (SCENITH) (n=4-5 souris/groupe). (B) Dosage de l'IFN γ et du Granzyme B dans le foie total des souris nourries avec le MCDD (n=6 à 13 souris/groupe). (C) Etude des fonctions effectrices des cellules NK (IFN γ et capacité de dégranulation) après 4 semaines de MCDD par cytométrie en flux (n=3-10 souris/groupe). (D) Etude de la capacité de prolifération (Ki67) et de recrutement (CXCR3) des cellules NK après 4 semaines de MCDD par cytométrie en flux (3-5 souris/groupe).

Analyse statistique : two-way ANOVA.

Conclusion

Bien que nos résultats obtenus *ex vivo*, après une stimulation du récepteur NK1.1, laissent penser que CD44 pourrait réguler les fonctions cytotoxiques des cellules NK par le métabolisme (glycolyse) d'une manière indépendante de la voie classique mTOR/cMyc/Slc7a5, il semblerait qu'au cours de la MASH, ce soit plus particulièrement la fonction cytokinique des cellules NK invalidées par CD44 qui soit altérée. Nous nous sommes donc intéressés à un autre moyen d'activer les cellules NK : le LPS. En effet, la dysbiose et les perturbations de l'intégrité de la barrière intestinale durant l'obésité, favorisent la pénétration des produits bactériens, dont le LPS, dans le foie, en passant par la circulation sanguine. C'est pourquoi, dans notre manuscrit, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la régulation des fonctions des cellules NK par CD44 après une activation par le LPS.

2- Etude de la capacité de prolifération et de recrutement des cellules NK invalidées pour CD44 après 4 semaines de MCDD.

Dans les figures 2C et 2E de notre manuscrit, nous avons montré que l'invalidation de CD44 au sein des ILC NKp46⁺ affectait négativement le nombre d'ILC NKp46⁺ hépatiques (cellules NK et ILC1) à l'état basal et après 4 semaines de MCDD. Nous avons donc évalué différents mécanismes pouvant être impliqués dans cette diminution (recrutement et prolifération).

L'invalidation spécifique de CD44 au sein des ILC NKp46⁺ ne semble pas influencer le recrutement des cellules NK (Figure 20D).

Notre première piste a donc été d'étudier le recrutement des cellules NK au niveau du foie. Pour ce faire, nous avons regardé par cytométrie en flux le pourcentage de cellules NK exprimant positivement le récepteur de chimiokines CXCR3 après 4 semaines de MCDD. Pour les souris contrôles et invalidées spécifiquement pour CD44 sous régime standard aucune modification de l'expression de CXCR3 n'a été constatée. Par la suite, comme il est décrit dans la littérature, nous avons bien observé une augmentation de CXCR3 chez les souris contrôles et invalidées spécifiquement pour CD44 nourries avec du MCDD par rapport aux groupes de souris sous régime standard. Enfin, en comparant le profil des cellules NK contrôles à celui des cellules NK invalidées significativement pour CD44 de souris nourries au MCDD, nous avons pu conclure qu'aucune modification de l'expression de CXCR3 n'a été constatée. Ainsi la diminution du nombre de cellules NK dans le foie des souris invalidées pour CD44 dans les cellules NKp46⁺ ne semble pas liée à un défaut de recrutement par l'axe CXCR3-CXCL10.

L'invalidation spécifique de CD44 au sein des ILC NKp46⁺ entraîne la diminution de capacité de prolifération des cellules NK (Figure 20D).

Notre seconde piste a été d'étudier la capacité de prolifération des cellules NK hépatiques au cours du MCDD. Nous nous sommes donc intéressés par cytométrie en flux au pourcentage de cellules NK exprimant positivement le marqueur de prolifération Ki67. Dans un premier temps, nous avons observé sous régime standard que les souris invalidées spécifiquement pour CD44 dans les ILC NKp46⁺ présentaient une légère tendance à avoir l'expression de Ki67 diminuée par rapport aux souris contrôles. Par la suite, de manière intéressante nous retrouvons une nouvelle fois les mêmes données que dans la littérature indiquant que sous MCDD les cellules

NK contrôles voient diminuer leur capacité de prolifération. Par la suite, nous avons également observé que les cellules NK invalidées pour CD44 présentaient une diminution significative de l'expression du marqueur de prolifération Ki67 après 4 semaines de MCDD par rapport aux cellules NK de souris contrôles.

Conclusion

Il se pourrait donc que la diminution du nombre de cellules NK observée chez les souris spécifiquement invalidées pour CD44 dans les ILC NKp46⁺ et nourries au MCDD proviennent d'un défaut de leur capacité de prolifération.

3- *La déplétion des cellules NK dans un modèle murin de stéatohépatite semblerait diminuer les complications hépatiques.*

Dans la Figure 1 de notre papier, nous avons établi des corrélations positives entre le nombre de cellules NK et les complications hépatiques (ALT, stéatose, foci inflammatoires) associées à la MASLD. Ces données nous ont donc permis d'associer le rôle des cellules NK au développement et à l'évolution de la pathologie vers des stades plus sévères. Afin de valider ces observations mais également de dissocier le rôle des cellules NK de celui des ILC1 au cours de la MASH, nous avons récemment utilisé des souris où le facteur de transcription *Eomesodermine* (*Eomes*) est invalidé spécifiquement suite à l'expression de la recombinaison Cre mise sous le promoteur NKp46 (*Ncr1ⁱCre⁺Eomes^{flox/flox}*). Etant donné qu'*Eomes* est un facteur de transcription exclusivement nécessaire au développement des cellules NK, son invalidation entraîne donc par conséquent la déplétion exclusive des cellules NK, tandis que les ILC1 sont conservées, dans ce nouveau modèle murin. Les souris déplétées en cellules NK ont ensuite été nourries avec un MCDD durant 4 semaines qui correspond au stade d'apparition d'une MASH.

Le niveau d'ALT est uniquement diminué après 2 semaines de MCDD pour les souris déplétées en cellules NK (Figure 21A).

Dans un premier temps, nous avons évalué la souffrance hépatocytaire par le dosage des transaminases sériques (ALT, AST). Nous avons constaté qu'après deux semaines de MCDD (développement d'une stéatose simple), le niveau d'ALT est significativement plus faible pour les souris dépourvues de cellules NK par rapport aux souris contrôles, suggérant une amélioration de l'état général du foie. Cependant, après 4 semaines de régime, nous avons constaté que la diminution observée chez les souris déplétées en cellules NK n'est pas maintenue. Cependant, les souris déplétées en cellules NK ont maintenu leur niveau d'ALT tandis que ce sont les souris contrôles qui ont vu leur niveau diminué. Les mêmes observations ont été faites avec les niveaux d'AST à 2 et 4 semaines (résultats non présentés).

Le taux de triglycérides hépatiques semble diminuer chez les souris dépourvues de cellules NK après 4 semaines de régime (Figure 21B).

Dans le but de mieux comprendre le rôle relatif des cellules NK et des ILC1 au stade de la MASH, nous avons sacrifié nos souris après 4 semaines de régime MCDD. Les souris

dépourvues de cellules NK semblent présenter une diminution du taux de triglycérides (TG) au niveau hépatique. Ce résultat indiquerait donc que les souris déplétées en cellules NK stockeraient moins de TG et présenteraient potentiellement une diminution de la stéatose hépatique.

La stéatose et la fibrose sont significativement diminuées chez les souris dépourvues de cellules NK après 4 semaines de régime (Figure 21C).

Les analyses histologiques et les quantifications associées à la stéatose et à la fibrose ont clairement mis en évidence une diminution du développement de ces deux paramètres en absence de cellules NK après 4 semaines de MCDD. Le fait que la stéatose soit moins importante chez les souris dépourvues en cellules NK pourrait concorder avec la réduction du taux de TG précédemment décrit. La quantification de la fibrose par mesure de la surface totale de recouvrement des fibres de collagène sur la coupe du foie a clairement mis en évidence une diminution de son développement en absence de cellules NK.

L'expression génique des marqueurs de l'inflammation et de la fibrose est diminuée chez les souris dépourvues de cellules NK après 4 semaines de MCDD (Figure 21D).

Nous avons également pu constater une diminution de l'expression des gènes de l'inflammation (*Tnfa, Ccl2, Cd11b, Cd11c, CD44, Emr1*) et de la fibrose (*Timp1, Opn, Colla1, Tgfb*) chez les souris dépourvues de cellules NK après 4 semaines de MCDD confirmant ainsi une amélioration générale de l'état du foie en l'absence de cellules NK.

Conclusion

Ainsi nos premiers résultats préliminaires suggèrent que l'absence des cellules NK chez des souris mises sous MCDD diminue le degré de sévérité de la maladie hépatique suggérant un rôle délétère de ces cellules au stade de la MASH. Actuellement d'autres analyses et expériences sont en cours afin d'affiner le phénotype de ces souris.

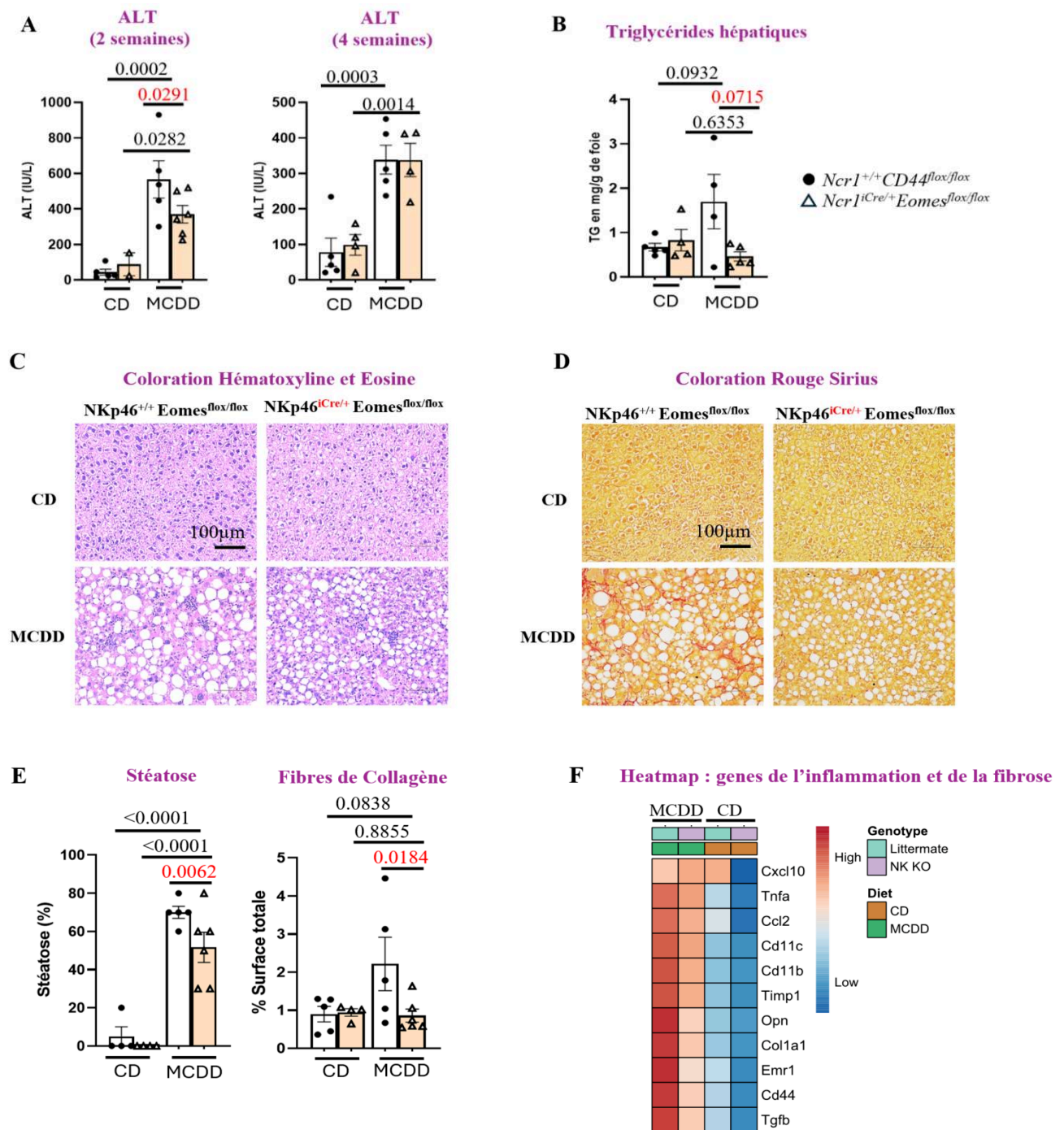


Figure 21. La déplétion des cellules NK dans un modèle de stéatohépatite (MCDD) améliore les complications hépatiques.

(A) Niveaux des alanine aminotransférase (ALT) après 2 semaines et 4 semaines de MCDD. (B) Niveaux des triglycérides hépatiques après 4 semaines de MCDD. Colorations hématoxyline et éosine (C) et Rouge Sirius (D) sur les coupes de foie après 4 semaines de MCDD. (E) Quantification de la stéatose et des fibres de collagène. (F) Heatmap représentant l'expression génique des marqueurs de l'inflammation et de la fibrose après 4 semaines de MCDD. (n=4-5 souris/groupe)

Analyse statistique : two-way ANOVA.

RESULTATS PARTIE III

Résumé revue

L'obésité et la consommation excessive d'alcool sont les principales causes des maladies chroniques du foie dans les pays développés en raison de modes de vie inappropriés. L'inflammation est le facteur clé de ces anomalies hépatiques et favorise le développement de lésions plus sévères telles que la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Les cellules innées lymphoïdes (ILC) sont connues comme de puissants régulateurs de l'inflammation, de la mort cellulaire et de la cicatrisation des plaies, qui sont des processus impliqués dans la progression des maladies hépatiques chroniques. Cependant des rôles divergents, voir opposés ont été décrits entre les différentes sous-populations d'ILC au cours du développement des maladies hépatiques chroniques, en fonction du stade et de l'étiologie de la maladie. C'est pourquoi, nous trouvons intéressant de synthétiser au travers d'une revue, les rôles pathogéniques et/ou protecteurs des différentes sous populations d'ILC au cours des différents stades des maladies hépatiques chroniques liées à l'obésité et à l'alcool.

Roles of innate lymphoid cells in metabolic and alcohol-associated liver diseases



Manon Bourinet,¹ Rodolphe Anty,² Philippe Gual,^{1,*} Carmelo Luci^{1,*}

Summary

Innate lymphoid cells (ILCs) have been identified as potent regulators of inflammation, cell death and wound healing, which are the main biological processes involved in the progression of chronic liver disease. Obesity and chronic alcohol consumption are the leading contributors to chronic liver diseases in developed countries, due to inappropriate lifestyles. In particular, inflammation is a key factor in these liver abnormalities and promotes the development of more severe lesions such as fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Opposite roles of ILC subsets have been described in the development of chronic liver disease, depending on the stage and aetiology of the disease. The heterogeneous family of ILCs encompasses cytotoxic natural killer cells, the cytokine-producing type 1, 2 and 3 ILCs and lymphoid tissue inducer cells. Dysfunction of these immune cells provokes uncontrolled inflammation and tissue damage, which are the basis for tumour development. In this review, we provide an overview of the recent and putative roles of ILC subsets in obesity and alcohol-associated liver diseases, which are currently the major contributors to end-stage liver complications such as fibrosis/cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of European Association for the Study of the Liver (EASL). This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

The liver is a central organ that performs essential functions to maintain body homeostasis in response to metabolic and immunological cues. Hepatocytes account for 80% of total liver cells and the non-parenchymal fraction constitutes the remaining 20%.¹ The non-parenchymal fraction is mostly composed of sinusoidal endothelial cells and hepatic stellate cells (HSCs), which play a key role in the synthesis of extracellular matrix proteins and liver-resident immune cells. The functions of these immune cells are to maintain a state of tolerance as the liver is continuously exposed to food products, while defending against viruses, bacteria and toxins. Dysregulation of these functions may be the cause or the consequence of the development of chronic liver diseases which evolve from inflammation to fibrosis and towards more severe stages such as cirrhosis and cancer.²

Obesity is one of the main risk factors for developing the chronic liver diseases known as metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD).³ The worldwide prevalence of MASLD is growing in parallel with obesity, reaching nearly 33% of the population in 2022.⁴ MASLD has a wide pathological spectrum ranging from “simple” steatosis, characterised by lipid accumulation in hepatocytes, to metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH). MASH is a progressive and severe condition characterised by steatosis, a

persistent inflammatory state, hepatocyte death and a predisposition to more severe liver abnormalities such as fibrosis/cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC).^{2,4-7} The chronic inflammation associated with MASH is associated with the recruitment of circulating immune cells and polarization of liver innate immune cells towards a more inflammatory phenotype.²

Gut and adipose tissue are key players in the development and progression of MASLD. Alteration of the gut barrier and dysbiosis lead to increased intestinal permeability and consequently to a release of bacterial-derived products (pathogen-associated molecular patterns) that reach the liver via the portal vein.⁸⁻¹⁰ Pathogen-associated molecular patterns bind to pattern recognition receptors and accumulate in the liver, activating local immune cells and hepatocytes.^{2,11} The adipose tissue also plays an important role in the progression of MASLD. When energy intake is excessive, adipocyte storage is rapidly saturated, causing a deregulation of lipid metabolism. In parallel, macrophages that produce T helper 1-type cytokines (tumour necrosis factor- α [TNF- α], interferon- γ [IFN- γ]) are recruited into the adipose tissue, leading to increased lipolysis and the development of insulin resistance associated with hyperlipidaemia.¹² All these alterations are responsible for a modification in the secretion of several mediators at the hepatocyte (hepatokines) and

Keywords: innate lymphoid cells; MASLD; ALD; fibrosis; hepatocellular carcinoma

Received 24 July 2023;
received in revised form 9
October 2023; accepted 25
October 2023; available
online 11 November 2023

¹Université Côte d'Azur, INSERM, U1065, C3M, Nice, France; ²Université Côte d'Azur, CHU, INSERM, U1065, C3M, Nice, France

* Corresponding authors.
Address: Université Côte d'Azur, INSERM, U1065, C3M, Nice, France. (P. Gual) (C. Luci).
E-mail addresses: carmelo.luci@inserm.fr (C. Luci), philippe.gual@inserm.fr (P. Gual).



adipocyte (adipokines) level, activating the immune system and thus contributing to the development of MASLD.¹³ These intra- and extrahepatic mechanisms promote the development of MASLD and increase the susceptibility of patients to infection and cancers.^{14,15}

Alcohol-related liver disease (ALD) is the most common chronic liver disease in the world and causes more than 3.3 million deaths every year.¹⁶ A chronic and large consumption of alcohol (more than 20 g/day of alcohol for females and 30 g/day of alcohol for males) leads to a build-up of fats in the liver (steatosis) and to alcohol-related steatohepatitis, which is characterised by steatosis, hepatocyte ballooning and infiltration of neutrophils. Steatosis and steatohepatitis are critical in the development and progression of ALD. Furthermore, alcoholic hepatitis (AH) is a severe syndrome (symptoms of jaundice, fever, tachycardia, tachypnoea, hepatomegaly, leucocytosis with neutrophilia) that can occur at any stage of ALD. Like MASLD, adipose tissue and gut dysfunction trigger ALD pathogenesis. Indeed, the spectrum of liver alterations in ALD and MASLD share common mechanisms but with their own characteristics (alcohol metabolism, specific dysbiosis, insulin resistance and inflammation of adipose tissue).^{17–19} Histopathological characteristics of ALD include acute portal inflammation, high neutrophil infiltration, alcoholic foamy degeneration and cholestasis.²⁰

HCC is the sixth most common cancer in the world but the third leading cause of cancer deaths. Its incidence has tripled in developed countries over the past three decades,^{21,22} and is associated with the incidence of ALD and MASLD. Dysregulation of the local microenvironment and chronic inflammation associated with altered genetic/epigenetic modifications promote HCC development and progression.^{23,24} Advanced HCC (with portal invasion and/or extrahepatic spread) accounts for around a third of all treated cases. Recently, immune checkpoint inhibitors (ICIs), administered alone or with anti-angiogenic agents, have been shown to significantly improve survival and quality of life compared with the multi-targeted kinase inhibitors previously used in patients with advanced HCC. In fact, based on their improved efficacy and acceptable tolerability, ICIs are currently being evaluated in patients with mid-stage or even early-stage HCC.^{25,26} However although a significant increase has been observed in the median survival rate, not all patients respond to ICIs.²⁷ Therefore, it is critical to better characterise the hepatic microenvironment during HCC development and to better understand the interplay between local immune cells and neighbouring cells in order to find new anti-tumour approaches and improve existing strategies.

The family of innate lymphoid cells (ILCs) has recently received attention in the field of liver diseases, as these cells regulate inflammation and fibrosis and therefore the development of cancer. Since they were first identified in 2008–2009, ILC subsets have been extensively described and discussed in many reviews.^{28–30} Briefly, ILCs are non-T and non-B lymphocytes that lack rearranged antigen receptors; they form a heterogeneous group and can be divided into five subsets: cytotoxic natural killer (NK) cells, type 1, 2 and 3 ILCs (ILC1, ILC2, ILC3) and lymphoid tissue inducer (LTI) cells.^{28,31–33} These cells share similarities with T helper cells and cytotoxic T cells at both the transcriptional and functional levels and most of them are cytokine producers and tissue-resident cells (gut, skin, lung, liver, adipose tissue), with the exception of NK cells which are circulating cytotoxic cells.³⁴ ILCs regulate tissue homeostasis but also contribute to the onset of disease through their ability to

Key points

- Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) and alcohol-related liver disease (ALD) are the leading types of chronic liver diseases in the developed world.
- Hepatocellular carcinoma is one of the most lethal cancers and patients with alcohol use disorder or obesity are at increased risk of developing it.
- Natural killer (NK) cells, and innate lymphoid cell (ILC)1 and ILC2 subsets have been found to play opposite roles (protective or pathogenic) in MASLD and ALD, depending on the stage and aetiology of the disease.
- NK cells and ILC1 have opposite roles in triggering steatohepatitis depending on the aetiology.
- ILC2 may be protective in MASLD but deleterious in ALD and ILC3 seem to be protective in MASLD and ALD.
- NK cells protect against liver fibrosis and HCC while ILC1, 2 and 3 may be deleterious.

produce proinflammatory and regulatory cytokines in response to local injury or infection^{35,36} (Fig. 1). Dysregulation of ILC activity can contribute to inflammatory disorders, thus they play a role in tumour-associated inflammation.^{37–42} LTI cells are essential for the formation of the secondary lymphoid organs during embryogenesis. In adulthood, bone marrow Lti cells replace these embryonic Lti cells and Lti-like subsets have been described in adult gut mucosa. However, their role in adult diseases is not yet well understood and needs to be studied in more detail.⁴³ There is growing interest in the contribution of ILC subsets to the regulation of liver disease. Whether they play a pathogenic or protective role in the development of disorders is a matter of debate, which may be due to the difficulty of accurately identifying each subset.

Here, we summarize current knowledge regarding the involvement of ILC subsets in regulating the development and progression of metabolic and alcohol-related liver disease in order to better understand the pathogenesis of these liver diseases and the therapeutic potential of targeting these cells.

NK cells and ILC1 in MASLD

The pathogenic or protective role of NK cells in MASH/MASLD has long been debated. This may be due to the difficulty of distinguishing conventional NK cells from tissue-resident hepatic ILC1 (also called liver-resident NK cells in some studies), which share some similarities, but which are functionally different. Conventional NK cells and ILC1 together account for approximately 30% and 10% of the total lymphocytes in the livers of humans and mice, respectively.⁴⁴ NK cells have more “killing” properties, with higher expression of granzyme B and perforin than ILC1, although recent studies indicate that under certain conditions, ILC1 also exhibit cytotoxicity.^{45,46} However, the phenotypic and developmental properties that distinguish NK cells and ILC1 are often unclear and confusing, based on evidence from different organs and pathological conditions.^{47,48} RNA sequencing approaches have therefore been increasingly used to better characterise and differentiate NK cells and ILC subsets.^{49–51} The purpose of our review is not to resolve these discrepancies, which are widely discussed elsewhere, but rather to outline the pathogenic or protective roles of these cells in chronic liver diseases associated with obesity or alcohol consumption.

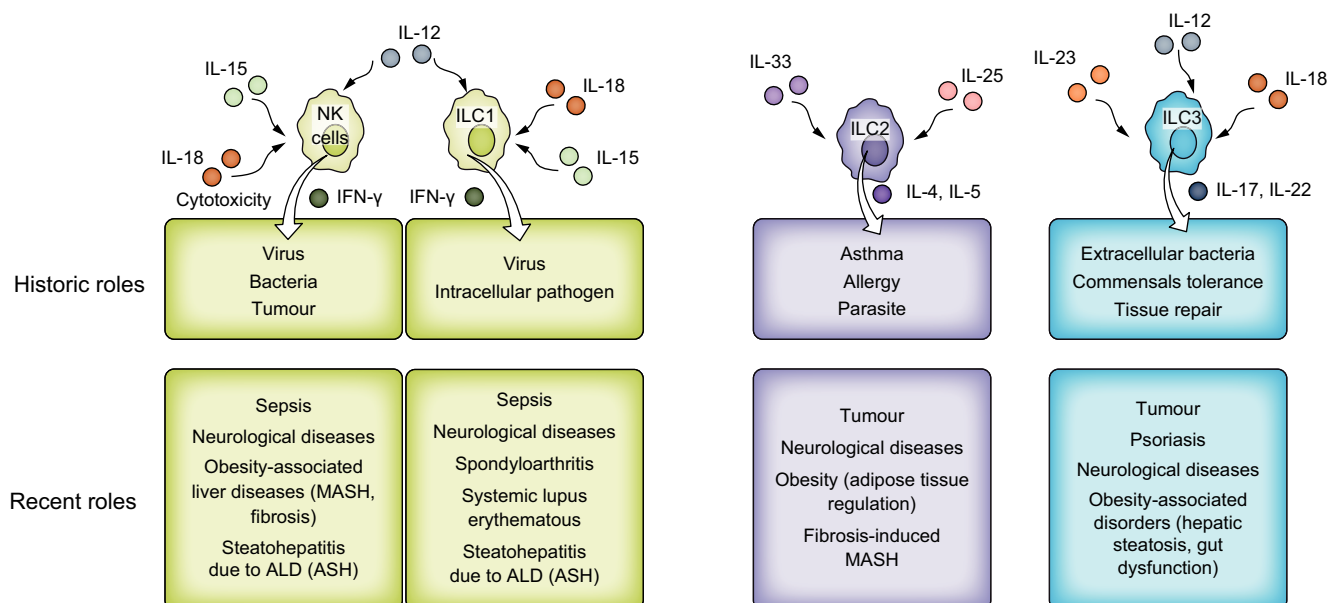


Fig. 1. Major contributions of ILC subsets to immunity. Historically described roles and the main recently discovered contributions of ILCs to immune responses are described. ILC(s), innate lymphoid cell(s); ILC1-3, type 1-3 ILC(s); MASH, metabolic dysfunction-associated steatohepatitis; MASLD, metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; NK, natural killer.

Cytokines are known potent regulators of immune cell development, activation and functions.⁵² In particular, interleukin (IL)-12, IL-15 and IL-18 together control the homeostasis of NK cells and the ILC1 subset.⁵³ *Il15*-knockout (KO) mice fed a high-fat diet (HFD) show a reduction of hepatic steatosis and liver expression of chemokines (CCL2, CCL5, CXCL10) known to attract NK cells. In turn, immune and NK cell infiltration into the liver are lower in diet-induced obese mice in comparison to control-diet mice.⁵⁴ Albeit only correlative, these results suggest that the absence of IL-15 could affect the biology of these cells as well as other immune cells such as NKT cells and/or subsets of CD8 T cells. Consistent with this, it was recently shown that IL-15 induces auto-aggressive hepatic CXCR6⁺ CD8 T cells by down-regulating FOXO1 (forkhead box O1) transcription factor expression during MASH, causing increased liver damage.⁵⁵ The study by Cepero *et al.* also hints that NK cells play a pathogenic role in the onset of MASH.⁵⁴ Therefore, although IL-15 is a key cytokine for NK cell development and biology at steady state, a local overproduction of IL-15 appears to be deleterious during MASH. A recent study supported this observation, showing that activated NK cells promote diet-induced MASH (methionine- and choline-deficient diet or choline-deficient HFD).⁵⁶ When challenged with a MASH diet, *Nfil3* (nuclear factor interleukin 3 regulated) KO mice, which lack NK cells but retain ILC1, showed reduced liver steatosis, inflammation and injury compared to control mice. This protective mechanism involves the reduction of JAK-STAT and NF-κB-p65 signalling in hepatocytes. In contrast, depletion of NKp46⁺ cells, which encompass NK cells and ILC1, aggravates MASH.⁵⁷ These data suggest that NK cells play a pathogenic role while ILC1 possibly play a protective role during MASH development. Further, the depletion of NK cells/ILC1 is not liver specific in *Nfil3*-KO mice. Thus, we cannot rule out that NK cells/ILC1 act via the regulation of gut and adipose tissue function, which are also important in the development and progression of MASLD. Further investigation is needed to explore

the regulation of mechanisms controlling NK cell and ILC1 functions to determine the precise role of these subsets in MASH progression.

NK cells and ILC1 in ALD

The immunosuppressive effect of alcohol has clearly been established for several years, and patients with chronic alcohol consumption are more susceptible to infection.^{58,59} Regarding NK cells, it has been reported that chronic alcohol consumption decreases the number and cytotoxicity of NK cells in human peripheral blood. The reduction in NK cell degranulation capacity has been related to decreased natural killer group 2, member D (NKG2D) receptor expression.⁶⁰⁻⁶³ Primary pre-clinical studies have provided insights into the effect of alcohol on NK cells and their contribution to the development of ALD. As observed in circulating NK cells in humans, alcohol has an immunosuppressive effect on murine hepatic NK cells, with a decrease in their number and cytotoxic functions after chronic alcohol consumption.⁶⁴ Furthermore, chronic plus single-binge ethanol consumption suppressed NK cell activity, which is partly due to IL-10 secreted by NKT cells, leading to the aggravation of liver steatosis.⁶⁰ In addition, the removal of HSCs by hepatic NK cells is impaired in ethanol-fed mice which is mainly related to a reduction in the expression levels of NKG2D and IFN-γ. This decrease in NK cell activity has been associated with aggravation of liver fibrosis.⁶⁵ Alcohol consumption also compromises the development and maturation of NK cells due to IL-15 deficiency.^{66,67} This reduction in liver IL-15 levels upon ethanol feeding has been related to a decrease in IL-15-producing cells (IL15⁺CD11c^{hi} cells), and exogenous IL-15/IL-15 Rα supplementation is sufficient to normalise hepatic NK cell numbers.⁶⁸ However, all these studies defined NK cells as CD3⁺NK1.1⁺ and did not distinguish NK cells from ILC1. The study of Zhang *et al.* addressed this point and demonstrated that 3 months of chronic

alcohol consumption significantly decreased Eomes-expressing NK cells without affecting ILC1.⁶⁶ Furthermore, the relative contributions of murine hepatic NK cells and ILC during alcoholic steatohepatitis have recently been investigated.⁶⁹ Chronic (10-days chronic) plus single-binge ethanol feeding in mice induced apoptosis of NK cells resulting in ILC1 dominance and a negative outcome. Restoration of NK cells by cell transfer protected mice from alcohol-induced steatohepatitis, revealing the protective role of NK cells. In contrast, hepatic ILC1 promoted the development and aggravation of steatohepatitis through the secretion of IL-17.⁶⁹ In parallel, NK-cell-derived IFN- γ , which is significantly downregulated after chronic alcohol consumption, inhibits IL-17 A production. This study highlighted the protective role of NK cells in ALD, whereas ILC1 appeared to be deleterious. It now remains to be determined whether this phenomenon also occurs in humans and thereby whether targeting the balance between NK cells and ILC1 holds therapeutic potential.

ILC2 in MASLD

Liver ILC2 represent less than 5% of all ILCs and have been little studied in the context of liver diseases. However, their role in white adipose tissue (WAT) dysfunction has been well described during obesity, which could influence the progression of associated liver diseases. In response to local IL-33, WAT ILC2 produce enkephalins and type 2 cytokines and are involved in the browning of adipose tissue via IL-4R α signalling. Further, the activation of ILC2 by IL-33 is sufficient to promote the growth of functional beige fat.^{70,71} Adipose tissue browning by increasing caloric expenditure could limit the development of obesity and improve insulin sensitivity, dyslipidaemia and MASLD.^{72,73} It has been reported that elevated brown adipose tissue (BAT) activity is associated with improvement of metabolic disorders, and patients with MASLD displayed lower BAT activity, which could be due to defective ILC2. Specifically, it has been suggested that increased BAT ILC2 activity could ameliorate chronic liver diseases associated with obesity.^{74,75} However, the role of hepatic ILC2 in MASLD remains to be determined.

ILC2 in ALD

Currently there are no reports concerning the potential role of ILC2 in ALD. However, as for other ILCs, it is possible that alcohol may cause a deregulation of ILC2. In a cohort of 12 patients with cirrhosis of different aetiologies, those with alcohol-related cirrhosis (n = 4) showed the highest expression of IL-33.⁷⁶ IL-33 is a potent activator of ILC2, which may facilitate the progression of fibrosis towards cirrhosis through the subsequent release of IL-13 by activated ILC2 (discussed below). Further studies are needed to evaluate the contribution of ILC2 to ALD more precisely.

ILC3 in MASLD

ILC3 are relatively rare in the liver but are present in large numbers in the intestine where they actively protect against infections. Depending on the expression of the activator receptor NKp46, ILC3 express RAR-related orphan receptor-gamma t (ROR γ t) and are classified into three subpopulations: NKp46⁺ ILC3 (NCR⁺ ILC3), NKp46⁻ ILC3 (NCR⁻ ILC3) and LTi cells. It has been shown that NCR⁺ ILC3 are the main source of hepatic IL-22, unlike NCR⁻ ILC3 which produce significant quantities of IL-17 A.^{77,78} The role of ILC3 and IL-22 in metabolic diseases has also

been addressed. It has been shown that IL-22 secreted by ILC3 plays a protective role in HFD-induced hepatic steatosis via its regulation of hepatic lipid metabolism.⁷⁹ Further, in genetically obese leptin receptor-deficient (db/db) mice and HFD-fed mice, administration of exogenous IL-22 reverses many metabolic symptoms, such as insulin resistance and hyperglycaemia.⁸⁰ Recently, a study described the protective role of ILC3 in mice with high-fat diet-induced steatohepatitis.⁸¹ ILC3 deficient mice (ROR γ t^{KI/KI}) fed an HFD display significant fatty liver and liver fibrosis, as well as elevated hepatic and circulating palmitic acid levels, a key activator of proinflammatory macrophages. These activated macrophages are an important source of IL-23 which enhances the proliferation/activation of IL-22-producing ILC3. The secreted IL-22 in the liver then regulates lipid metabolism, decreases inflammation and has anti-apoptotic activity. Further, exogenous IL-22 administration ameliorates liver injury, inflammation, and fibrosis in diet-induced MASH mice, by correcting liver oxidative stress and attenuating inflammatory functions of hepatocyte-derived, mitochondrial DNA-enriched extracellular vesicles.⁸²

ILC3 in ALD

To date, no study has directly described the role of hepatic ILC3 in ALD in humans and mice. However, it has been shown in a mouse model that gut ILC3 secrete decreased levels of IL-22 after chronic plus binge ethanol feeding. This reduction in IL-22 secretion was reported to be the result of ethanol-induced intestinal dysbiosis and decreased levels of indole-3-acetic acid, a microbiota-derived aryl hydrocarbon receptor ligand, which regulates IL-22 expression. This deregulation leads to reduced expression of the antimicrobial peptide REG3 (regenerating islet-derived protein 3 gamma), which promotes bacterial translocation to the liver and leads to the development of alcohol-related steatohepatitis. This study also showed that in mice fed with *Lactobacillus reuteri* engineered to produce IL-22, along with a chronic-binge alcohol diet, liver inflammation and injury were reduced and intestinal expression of IL-22 was upregulated.⁸³ Thus, even if the role of hepatic ILC3 is not clearly described in ALD, intestinal ILC3 seem to play a protective role in the development of alcohol-induced hepatic complications through the gut/liver axis.

ILCs in fibrosis

Fibrosis and its advanced stage, cirrhosis, are caused by the repeated death of a critical fraction of hepatocytes due to persistent inflammation or infection, resulting in a loss of liver tissue organisation and function. HSCs, located between hepatocytes and the endothelial cells of the sinusoids in the space of Disse, are key actors in the development of fibrosis. During chronic inflammation, HSCs are activated by cytokines and transdifferentiate into myofibroblasts, resulting in the production of huge amounts of fibrous proteins (collagen, laminin, fibronectin). The balance between the production of this extracellular matrix and its degradation influences the evolution of fibrosis.⁸⁴

Because ILCs have only recently been identified, few studies have investigated their role in the pathogenesis of fibrosis induced by a metabolic and/or alcoholic insult and such studies have mainly used mouse models of liver damage induced by administration of hepatotoxic compounds, such as carbon tetrachloride (CCl₄). NK cells are the most well-studied ILC subset

in the development of fibrosis. Several studies using mouse models of diet and/or chemical induced-liver fibrosis have reported that NK cells work against fibrosis by eliminating HSCs.^{57,85–88} HSCs can be “killed” by NK cells through the interaction of activating/inhibitory NK cell receptors and ligands differentially expressed by the activated HSCs during their differentiation, for example, RAE-1 (ribonucleic acid export-1) recognised by the NKG2D receptor, or a lack of MHC I expression, which triggers NK cell activation.^{89–91} Other mechanisms involve the anti-fibrotic activity of IFN- γ , which inhibits HSC proliferation and attenuates pro-fibrogenic transforming growth factor- β (TGF- β) signalling.⁸⁷ The source of IFN- γ might be hepatic NK cells but could also be ILC1, making both cell types important in the resolution or prevention of fibrosis in chronic liver diseases. Using mouse models of MASLD-induced hepatic fibrosis, it has been shown that the regulation of fibrotic MASH depends on the interaction between liver NK cells and macrophages. The depletion of NK cells and/or ILC1 favours the polarization of alternatively activated macrophages at the expense of the proinflammatory macrophages that lead to MASLD progression.^{57,92} These data provide insight into the contributions of NK cells and ILC1 during the development of fibrotic MASH in a metabolic context.⁹³ Furthermore, ILC2 could also be involved in fibrosis associated with MASLD in an IL-33-dependent manner, as reported in a mouse model of diet-induced MASH.⁹⁴ The results showed an increase in the expression of IL-33 and its receptor ST2 in the livers of mice fed a methionine- and choline-deficient diet or a HFD. While IL-33 treatment attenuated hepatic steatosis, reduced serum alanine aminotransferase activity, and improved systemic insulin resistance and glucose intolerance, liver fibrosis was aggravated in an ST2-dependent manner. Although this study does not clearly indicate the involvement of ILC2, the results are in line with previous data showing the involvement of ILC2 in liver fibrosis.⁹⁵ In a mouse model of liver fibrosis induced by CCl₄ treatment, IL-33 was released in response to chronic hepatocellular stress, leading to the accumulation and activation of hepatic ILC2 in a ST2 signalling-dependent manner. In turn, activated ILC2 produce IL-13, promoting the activation of HSCs. Human studies confirmed that ILC2 activation is strongly correlated with fibrosis severity.⁷⁶ Since patients with fibrotic livers are at increased risk of developing cancer, this could suggest ILC2 plays a pathogenic role in HCC development. It has recently emerged that IL-22- and IL-17-producing ILC3 subsets are also important in liver fibrosis. The role of IL-22 in fibrosis development has mainly been studied in mouse models of CCl₄-induced fibrosis. A decade ago, it was reported that IL-22 ameliorates hepatic fibrosis by activating the STAT2 pathway, thereby inducing HSC senescence and inhibiting HSC activation.⁹⁶ However, a more recent study refutes this hypothesis and highlights the pathogenic role of ILC3 in hepatic fibrosis.⁹⁷ An increase in ILC3 (Lin⁻CD127⁺ROR γ ⁺) was found in mouse fibrotic livers, which contained more subpopulations of ILC3 IL-17 A⁺ and ILC3 IL-22⁺ than ILC3 populations from control mice. Furthermore, the adoptive transfer of ILC3 into *Rag1*^{-/-} ILC-depleted mice resulted in a significant increase in HSC activation. These apparently contradictory results might be explained by differences in technical approaches, such as the sorting and transfer of the very rare population of ILC3 *in vivo*, and thus further investigation is needed to ascertain the role of ILC3 in liver fibrosis. Recently, in human fibrotic liver, an “unconventional” ILC3-like cell producing the ILC2-related cytokine IL-13 was identified. The frequency of this subset was higher in

fibrotic livers than in healthy livers, and IL-13⁺ ILC3-like cells can modulate HSC activation by upregulating inflammatory genes/proteins such as the monocyte-chemoattractant chemokine CXCL8.⁹⁸

Together, these data strongly support that ILC subsets play a complex but important role in the pathogenesis of fibrosis and must be considered in future studies and therapeutic strategies.

ILCs in HCC

Studies examining the role of ILCs in cancer, including HCC, have yielded contradictory results, with some studies suggesting a role in tumour progression while others suggest that ILCs confer antitumor properties.⁹⁹ However, the results are more consistent for the NK cell subset. NK cells represent a key weapon against tumours, as they have the unique ability to detect and eliminate malignant cells without any sensitization.^{91,100} It has been shown that the number of CD56⁺ NK cells infiltrating the liver in patients with HCC (aetiology not provided) positively correlated with survival and the elimination of cancer cells, confirming that NK cell activity protects against cancer.¹⁰¹ In addition, decreased IFN- γ production, upregulation of the expression of NK cell inhibitory receptors (NKG2A, TIM3, CD96) and downregulation of the expression of NK cell activating receptors (NKp46, NKG2D, TIGIT, Siglec7, CD160 and NKp30) were reported in patients with HCC.¹⁰¹ Furthermore, in patients with advanced HCC, NKp30-positive NK cells show reduced expression of immunostimulatory splice variants of NKp30 (NKp30a and NKp30 b) and increased expression of the inhibitory variant NKp30c.¹⁰² These studies indicate that tumour-infiltrating NK cells are deregulated in HCC and have a reduced capacity to eliminate cancer cells. This reduction in NK cell activity could be mediated by different cells and mechanisms, for example by tumour-derived monocytes/macrophages, which boost the CD48/2B4 inhibitory axis, or by myeloid-derived suppressor cells, which reduce the NKp30 receptor activating signalling pathway.^{103,104} Co-culture of NK cells with cancer-associated fibroblasts (HCC-associated fibroblasts from tumour tissues) also leads to inhibition of NK cell functions with a reduction in the expression of activating receptors and the production of granzyme B, perforin, IFN- γ and TNF- α .¹⁰⁵ Zhang *et al.*, uncovered the infiltration of double-negative CD11b⁻CD27⁻ NK cells into the tumour tissue of patients with HCC. This population displays an immature phenotype with impaired cytotoxic capacity and IFN- γ production. These infiltrating double-negative NK cells could explain the NK cell dysfunction observed in patients with HBV-related HCC and their tumour progression.¹⁰⁶

Currently, most findings regarding the involvement of NK cells in HCC have been observed in humans while few pre-clinical studies are available. This may be explained by the difficulty in generating mouse models that reach the HCC stage exclusively through diet-induced MASLD. Mouse models of HCC are most often transplanted tumour models where cells from human cancer cell lines are injected subcutaneously into mice. In the study of Yu *et al.*, the Hep3B cell line, representative of the invasive and oncogenic nature of HCC, was used to investigate the role of NK cells. The NK cells infiltrating these tumours showed a non-functional phenotype associated with high expression of the transcription factor NR4A1, a regulator of antitumor immunity.¹⁰⁷ The results thus appear to be consistent with human data, where dysfunctional NK cells in HCC are believed to promote tumour progression.

Table 1. Pathogenic and protective roles of ILCs in metabolic, alcohol-related.

	Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease	Alcohol-related liver disease	Liver fibrosis	HCC
NK cells	Pathogenic role: Responsible for inflammatory macrophage polarization ⁹³ JAK-STAT and NF-κB pathway activation in hepatocytes resulting in oxidative stress and hepatocyte damage ⁵⁶	Protective role: IFN-γ produced by NK cells inhibits IL-17 A production and consequently also liver inflammation ⁶⁹	Protective role: Leads to HSC apoptosis ^{57,85,86,89–91} IFN-γ inhibits HSC proliferation and pro-fibrogenic TGF-β signalling ⁸⁷	Protective role: Anti-tumoural activity ¹⁰¹
ILC1	Pathogenic or protective role: Not yet defined	Pathogenic role: Drives liver inflammation by producing IL-17 A ⁶⁹	Potential protective role: IFN-γ inhibits HSC proliferation and pro-fibrogenic TGF-β signalling ⁸⁷	Potential pathogenic role: NK cell conversion into ILC1-like cells by tumour microenvironment ^{112,113}
ILC2	Potential protective role: IL-33 treatment attenuated hepatic steatosis and liver injury ⁹⁴	Pathogenic or protective role: Not yet defined	Pathogenic role: Activated ILC2 promote HSC activation through IL-13 production ^{76,94,95}	Potential pathogenic role: Could contribute to an immunosuppressive microenvironment which favours tumour development ¹¹⁴ Potential protective role: High ILC2/ILC1 ratio is associated with better survival in patients with HCC ¹¹³
ILC3	Potential protective role: IL-22, produced by ILC3, decreases metabolic syndrome ^{79,80}	Potential protective role: Gut ILC3 indirectly promote the development of hepatic complications through gut/liver axis ⁸³	Potential pathogenic role: Lead to an increase in HSC activation ⁹⁷	Potential pathogenic role: IL-22 inhibits apoptosis and promotes tumour growth via STAT3 ^{117,118}

HCC, hepatocellular carcinoma; ILC(s), innate lymphoid cell(s); ILC1-3, type 1-3 ILC(s); NK, natural killer.

The contribution of ILC1 to the development of HCC is yet to be well documented. The tumour microenvironment could play an essential role in the orientation of the ILC1 phenotype, which may lead these cells to a variety of different fates.^{40,108} For example, in a mouse mammary tumour model, the abundance of IL-15 within the microenvironment leads to an increase in a specific subset of ILC1 that lacks expression of some ILC1-related proteins (CD127, TNF-α) but expresses granzyme B.¹⁰⁹ The inflammatory environment in a mouse model of cutaneous squamous cell carcinoma also favours the increase of a peculiar subset of ILC1 that produce less IFN-γ but more of the pro-inflammatory cytokine IL-6 in pre-cancerous lesions, which could contribute to tumour progression.⁴⁰ Furthermore, studies in other cancers (fibrosarcoma, colon carcinoma, lung carcinoma) have shown that NK cells can be converted into “ILC1-like” cells, mainly mediated by TGF-β released by the tumour microenvironment.^{110,111} Consistent with this, elevated concentrations of TGF-β were reported in the supernatant derived from human HCC.¹¹² The conversion of NK cells into “ILC1-like” cells could occur in HCC and could explain the decreased NK cell numbers discussed above. Heinrich *et al.* showed that the cytokine profile in the tumour microenvironment shapes ILCs in patients with HCC. Single-cell RNA sequencing and flow cytometry analysis of biopsies from patients with HCC also demonstrated the presence of NK-like cells in the non-tumour tissue. These cells lose their cytotoxic capacity as they evolve towards an ILC1-like profile.¹¹³ It would be of interest to evaluate whether HCC is infiltrated by the recently described cytotoxic ILC1 subset and, if so, how the HCC environment controls the fate of these cells.^{45,46} Taken together, these studies suggest that the reduced ability of NK cells to clear cancer cells or their reduced frequency through possible conversion into ILC1-like cells, as well as the increase in ILC1, could lead to HCC development.

As discussed above, recent studies have demonstrated that ILC2 play a pro-fibrogenic role in the liver in mice and in humans. Therefore, they may also contribute to HCC onset in the long

term. In line with this, a significant correlation has been reported between hepatic ILC2 number and poor prognosis in patients with HCC.¹¹⁴ The same study showed decreased expression levels of ILC2 activators (IL-33, IL-25) in HCC samples, and the loss of expression of KLRG1, a marker of ILC2 maturation. This suggests the existence of an HCC-derived ILC2 subpopulation that is functionally divergent from canonical ILC2. This population also produced elevated amounts of IL-13 and chemokines (such as CXCL2 and CXCL8) involved in neutrophil recruitment. The transfer of ILC2 into tumour-bearing mice confirmed the observation that these cells are associated with neutrophil recruitment, increased arginase expression and tumour burden.¹¹⁴ These hepatic ILC2 identified in mouse and human HCC could contribute to an immunosuppressive microenvironment that favours tumour development. However, the study published by Heinrich *et al.* reports contradictory results, suggesting that ILC2 play a protective role in human HCC. Specifically, the authors show that a high ratio of ILC2/ILC1 within patients' tumours is associated with better survival. The high ratio corresponds to an increase in tumour-associated ILC2 that could be dependent on cytokine levels, in particular IL-33, which may promote ILC2 activation.¹¹³ This discrepancy may be due to different origins of ILC2. ILC2 derived from ILC1 plasticity may not have the same phenotype as the ILC2 described by Xu *et al.* Furthermore, in human studies, the stages of HCC are not clearly specified and may potentially influence the type of ILC2 and their role in the tumour. The composition of the tumour microenvironment also seems to play an essential role in the behaviour of these cells and may potentially explain the divergent roles observed by the two studies.

Several studies using orthotopic models or hepatotoxic agents highlight the potential pro-tumoural role of liver ILC3 subsets in HCC development. The pro-tumorigenic role of IL-17 A, the cytokine noted above that is secreted by NCR⁺ ILC3, T helper 17 cells and γδ T cells, is clearly described in the literature.¹¹⁵ It has also been reported that liver NCR⁺ ILC3 promote the

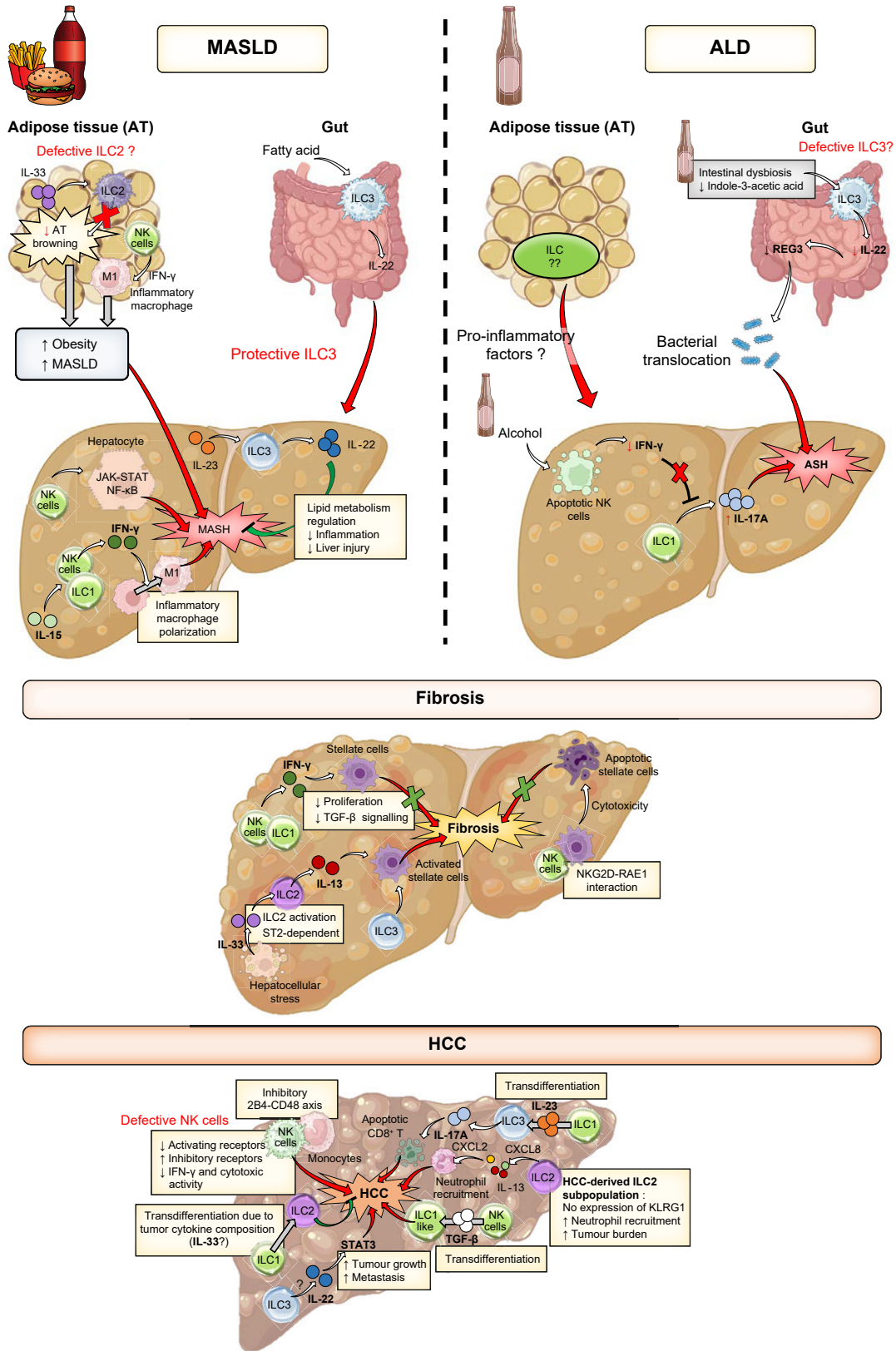


Fig. 2. Roles of ILC subsets in chronic liver diseases. ILC involvement in the development of: liver abnormalities after high-caloric (top left) or excessive/chronic alcohol consumption (top right); fibrosis (middle); and HCC (bottom). ALD, alcohol-related liver disease; ASH, alcohol-related steatohepatitis; AT, adipose tissue; HCC, hepatocellular carcinoma; ILC(s), innate lymphoid cell(s); ILC1-3, type 1-3 ILC(s); MASH, metabolic dysfunction-associated steatohepatitis; MASLD, metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; NK, natural killer.

development of HCC in response to IL-23 in an orthotopic mouse model (injection of hepa1.6 cell line into the liver) and a model of diethylnitrosamine-induced HCC.¹¹⁶ IL-23 promotes the differentiation of ILC1 into ILC3 in the tumour microenvironment which in turn produces IL-17 A but not IL-22. IL-17 A-producing NCR⁺ ILC3 respond to IL-23 present in the tumour microenvironment and directly promote CD8⁺ T apoptosis and in turn HCC progression.¹¹⁶ The role of NCR⁺ ILC3 in HCC progression has not yet been described. However, one study showed that patients with HCC had significant amounts of IL-22 in the tumour microenvironment. IL-22 inhibits apoptosis and promotes tumour growth and metastasis via STAT3 activation.¹¹⁷ Furthermore, a liver-specific IL-22 transgenic mouse model highlighted the involvement of IL-22 in liver carcinogenesis. IL-22 acts as a local paracrine factor capable of stimulating the proliferation of liver cancer cells.¹¹⁸ Thus, this study hints that IL-22-producing NCR⁺ ILC3 could play a pathogenic role during the development of HCC. Taken together, these studies support a potential pro-tumoural role for liver ILC3 subsets in HCC development. Further work is needed to investigate whether this is also true for metabolic and alcohol-induced HCC.

Targeting ILCs in liver diseases

Understanding the exact role of ILCs in inflammatory diseases or cancers is still the subject of intense research and the specific targeting of these cells for therapy is still in its infancy. Chronic inflammation is a key driver of MASLD and many efforts have been made recently to target inflammatory immune cells. Strategies to limit immune cell recruitment into the liver (CCR2/CCR5, CXCR2 antagonists) and/or their activation (inhibition of TLR4, NLRP3 inflammasome) in MASH have led to limited results, and they mainly target myeloid cells.¹¹⁹ NK cells/ILCs can also express these markers, at lower levels, thus it is possible that their functions will also be impacted by these treatments. In any case, since immune cells interact continuously and influence each other, NK cells/ILCs could also be affected indirectly by such approaches. The therapeutic manipulation of NK cells is much more advanced for oncological indications than for liver diseases. To date, over 200 clinical trials (clinicaltrials.gov) have been conducted to exploit their anti-tumoural properties. NK cell-based therapeutic approaches leading to promising results include infusion of activated and/or engineered NK cells, NK cell stimulation with cytokines and the use of agonistic and blocking antibodies that target NK cells.¹²⁰ Regarding the treatment of HCC, it has been shown that injecting allogeneic NK cells into patients increased progression-free survival.^{121,122} The use of chimeric antigen receptor (CAR)-modified NK cells also represents a promising approach in HCC treatment. CAR-NK cells have been engineered against glypican-3, c-MET oncoproteins, CD147 glycoprotein (immune cell activator) and TGF- β (inhibitor of NK cell cytotoxicity). These modified NK cells are fully functional, with increased IFN- γ production and cytotoxicity against HCC cell lines, and are able to reduce tumour growth in xenograft models.^{123–126} Cytokines targeting activation and expansion of NK cells (and/or other ILC subsets) are also being tested in cancer therapies, for example IL-2, IL-15 and IL-12. The strongest anti-tumoural response is induced by infusion of IL-2 but the use of this cytokine is limited by major adverse effects, such as an increase in regulatory T cells and tissue inflammation.¹²⁷ Mutated IL-2, engineered to limit toxicity, represents an attractive approach to boost NK cell anti-tumoural properties in HCC.¹²⁸ IL-

15 is known to activate NK cell proliferation and constitutes an alternative to IL-2, as it has the capacity to recover antitumor functionality in NK cells inhibited by in vitro exposure to HCC cell lines or extracted directly from HCC.¹²⁹ However, as mentioned above, the use of IL-15 could be deleterious in treating MASH as it favours the expansion of aggressive CD8 T cells and inflammatory NK cells, highlighting that the nature of the microenvironment constrains the use of this type of approach. Finally, strategies that target NK cell or ILC receptors and ICIs are also promising against chronic liver diseases. T cells were the first immune cells targeted by immunotherapy. However, NK cells and other ILC subsets have also been shown to express immune checkpoints (PD-1, TIGIT, LAG3, *etc.*) and thus studies focusing solely on T cells have underestimated the potential of targeting these cells as well.¹⁰⁰ Multispecific engagers, which target one or more activating NK cell receptors (NKp46, NKG2D, *etc.*) and/or cytokine receptors (IL-2 receptor) designed to stimulate NK cell function, represent a new class of therapeutic molecules being developed against cancer.¹³⁰ It would be of interest to evaluate the use of such molecules in chronic liver diseases and HCC.

A better characterisation of liver NK cells and ILC subsets at different stages of chronic liver diseases could lead to a better understanding of the mechanisms that regulate the local immune response and could help in the development of therapeutic strategies tailored to the liver microenvironment.

Conclusions

The involvement of ILCs in obesity- and alcohol-related liver disease is undeniable (Table 1). However, the exact nature of the protective or pathogenic roles these cells play remains difficult to elucidate. In this review we highlighted that their roles can rapidly change depending on the stage of progression of the disease due to changes in the microenvironment (Fig. 2). Currently, NK cells, due to their predominance among ILC populations in the liver, are the ILCs whose roles are best described. However, their close resemblance to ILC1 and their phenotypic heterogeneity often make their role difficult to assess. ILC2 and ILC3 are poorly represented in the liver and their involvement in this organ is not yet very well described, unlike their respective roles in adipose tissue and the gut. However, existing studies have allowed us to put forward several hypotheses that point to a pathogenic role for these cells that leads to HCC. New approaches combining single-cell RNA sequencing, flow cytometry and spatial transcriptomic technologies would help to better characterise ILC subsets in order to better understand their role within the tissue. The study of ILC metabolism could provide additional indicators of the role of these cells in different stages of obesity- and alcohol-related liver diseases, by giving insights into the functional activity of ILCs. Finally, targeting the immune system holds great promise in the fight against diseases, and in particular in cancer. Immunotherapy strategies that target ICIs and their effects on the host have mostly focused on T cells. ILCs also express inhibitory receptors and could thus be targeted by similar strategies. Recently developed cell therapy approaches that target NK cells (CAR-NK cells, multispecific NK cell engagers) to enhance their activities represent promising weapons in the fight against cancer. The development of ILC-based cell therapies that target these cells at different stages of MASLD and ALD could similarly represent a new therapeutic option that deserves further investigation.

Abbreviations

AH, alcoholic hepatitis; ALD, alcohol-related liver disease; BAT, brown adipose tissue; CAR, chimeric antigen receptor; CCl₄, carbon tetrachloride; HCC, hepatocellular carcinoma; HFD, high-fat diet; HSCs, hepatic stellate cells; ICIs, immune checkpoint inhibitors; IFN- γ , interferon- γ ; IL-, interleukin-; ILC(s), innate lymphoid cell(s); ILC1-3, type 1-3 ILC(s); KO, knockout; MASLD, metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; NK, natural killer; NKG2D, natural killer group 2, member D; TGF- β , transforming growth factor- β ; TNF- α , tumour necrosis factor- α ; WAT, white adipose tissue.

Financial support

This work is supported by grants from Institut National de la santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université Côte d'Azur and various charities (Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF) to CL, Société Nationale Française de Gastro-Entérologie (SNFGE) to RA. This work was also funded by the French Government (National Research Agency, ANR): #ANR-18-CE14-0019-02, #ANR-19-CE14-0044-01, #ANR-21-CE14-0015-03, # ANR-22-CE14-0027-01 and through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE (#ANR-11-LABX-0028-01) and the UCAJEDI Investments in the Future project (#ANR-15-IDEX-01). We would also like to thank Catherine Buchanan for her assistance with the English syntax and grammar in this manuscript. MB was successively supported by the ANR (#ANR-18-CE14-0019-02), and by doctoral grants from the French Ministry of Research and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

Conflict of interest

The authors of this study declare that they do not have any conflict of interest.

Please refer to the accompanying ICMJE disclosure forms for further details.

Authors' contributions

Manon Bourinet and Carmelo Luci designed and wrote the manuscript. Rodolphe Anty contributed to the clinical section of the introduction. Philippe Gual gave guidance on the outline and revised the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100962>.

References

- [1] Tsutsumi V, Nakamura T, Ueno T, et al. Chapter 2 - structure and ultra-structure of the normal and diseased liver. In: Muriel P, editor. *Liver pathophysiology* [Internet]. Boston: Academic Press; 2017 [cited 2023 Jan 27]. p. 23–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128042748000023>.
- [2] Luci C, Bourinet M, Leclère PS, et al. Chronic inflammation in non-alcoholic steatohepatitis: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Front Endocrinol* 2020 Dec 14;11:597648.
- [3] Rinella ME, Neuschwander-Tetri BA, Siddiqui MS, et al. AASLD Practice Guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2023 May;77(5):1797.
- [4] Riazi K, Azhari H, Charette JH, et al. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2022 Sep 1;7(9):851–861.
- [5] Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, et al. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019 Jul;16(7):411–428.
- [6] Tran A, Gual P. Non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013 Feb 1;37(1):17–29.
- [7] Cai J, Zhang XJ, Li H. Progress and challenges in the prevention and control of nonalcoholic fatty liver disease. *Med Res Rev* 2019;39(1):328–348.
- [8] Roy TL, Llopis M, Lepage P, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 2013 Dec 1;62(12):1787–1794.
- [9] Wang B, Jiang X, Cao M, et al. Altered fecal microbiota correlates with liver biochemistry in nonobese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* 2016 Aug 23;6(1):32002.
- [10] Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001 Feb;48(2):206–211.
- [11] Saltzman ET, Palacios T, Thomsen M, et al. Intestinal microbiome shifts, dysbiosis, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Front Microbiol* 2018;9:61.
- [12] Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007 Jan;117(1):175–184.
- [13] Vonghia L, Francque S. Cross talk of the immune system in the adipose tissue and the liver in non-alcoholic steatohepatitis: pathology and beyond. *World J Hepatol* 2015 Jul 28;7(15):1905–1912.
- [14] Viel S, Besson L, Charrier E, et al. Alteration of Natural Killer cell phenotype and function in obese individuals. *Clin Immunol* 2017 Apr 1;177:12–17.
- [15] Ringel AE, Drijvers JM, Baker GJ, et al. Obesity shapes metabolism in the tumor microenvironment to suppress anti-tumor immunity. *Cell* 2020 Dec 23;183(7):1848–1866.e26.
- [16] Galle PR, Forner A, Llovet JM, et al. EASL clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2018 Jul 1;69(1):182–236.
- [17] Tang H, Sebastian BM, Axhemi A, et al. Ethanol-induced oxidative stress via the CYP2E1 pathway disrupts adiponectin secretion from adipocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 2012 Feb;36(2):214–222.
- [18] Llopis M, Cassard AM, Wrzosek L, et al. Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to alcoholic liver disease. *Gut* 2016 May 1;65(5):830–839.
- [19] Ntandja Wandji LC, Gnemmi V, Mathurin P, et al. Combined alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. *JHEP Rep* 2020 May 22;2(3):100101.
- [20] Tiniakos DG. Liver biopsy in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis patients. *Gastroentérologie Clin Biol* 2009 Oct 1;33(10):930–939.
- [21] Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, et al. Diagnosis, staging, and management of hepatocellular carcinoma: 2018 practice guidance by the American association for the study of liver diseases. *Hepatology* 2018;68(2):723–750.
- [22] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2019 Apr 11;380(15):1450–1462.
- [23] Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primer* 2021 Jan 21;7(1):1–28.
- [24] Craig AJ, von Felden J, Garcia-Lezana T, et al. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020 Mar;17(3):139–152.
- [25] Rimassa L, Finn RS, Sangro B. Combination immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2023 Aug 1;79(2):506–515.
- [26] Finn RS, Qin S, Ikeda M, et al. Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2020 May 14;382(20):1894–1905.
- [27] Giraud J, Chalopin D, Blanc JF, et al. Hepatocellular carcinoma immune landscape and the potential of immunotherapies. *Front Immunol* 2021 Mar 18;12:655697.
- [28] Vivier E, Artis D, Colonna M, et al. Innate lymphoid cells: 10 Years on. *Cell* 2018 Aug 23;174(5):1054–1066.
- [29] Barrow AD, Colonna M. Exploiting NK cell surveillance pathways for cancer therapy. *Cancers* 2019 Jan 8;11(1):55.
- [30] Korchagina AA, Koroleva E, Tumanov AV. Innate lymphoid cell plasticity in mucosal infections. *Microorganisms* 2023 Feb 12;11(2):461.
- [31] Luci C, Reynders A, Ivanov, et al. Influence of the transcription factor ROR γ t on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. *Nat Immunol* 2009 Jan;10(1):75–82.

- [32] Sanos SL, Bui VL, Mortha A, et al. ROR γ t and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22–producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* 2009 Jan;10(1):83–91.
- [33] Cella M, Otero K, Colonna M. Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1 β reveals intrinsic functional plasticity. *Proc Natl Acad Sci* 2010 Jun 15;107(24):10961–10966.
- [34] Gasteiger G, Fan X, Dikiy S, et al. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and non-lymphoid organs. *Science* 2015 Nov 20;350(6263):981–985.
- [35] Korchagina AA, Koroleva E, Tumanov AV. Innate lymphoid cells in response to intracellular pathogens: protection versus immunopathology. *Front Cel Infect Microbiol* 2021 Dec 6;11:775554.
- [36] Schulz-Kuhnt A, Wirtz S, Neurath MF, et al. Regulation of human innate lymphoid cells in the context of mucosal inflammation. *Front Immunol* 2020 Jun 23;11:1062.
- [37] Buonocore S, Ahern PP, Uhlrig HH, et al. Innate lymphoid cells drive IL-23 dependent innate intestinal pathology. *Nature* 2010 Apr 29;464(7293):1371–1375.
- [38] Halim TYF, Krauß RH, Sun AC, et al. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity* 2012 Mar 23;36(3):451–463.
- [39] Kim BS, Siracusa MC, Saenz SA, et al. TSLP elicits IL-33–independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *Sci Transl Med* 2013 Jan 30;5(170):170ra16.
- [40] Luci C, Bihl F, Bourdely P, et al. Cutaneous squamous cell carcinoma development is associated with a temporal infiltration of ILC1 and NK cells with immune dysfunctions. *J Invest Dermatol* 2021 Oct 1;141(10):2369–2379.
- [41] Yang Z, Tang T, Wei X, et al. Type 1 innate lymphoid cells contribute to the pathogenesis of chronic hepatitis B. *Innate Immun* 2015 Aug 1;21(6):665–673.
- [42] Rao Y, Le Y, Xiong J. *Front Immunol* 2021 May;12:666045.
- [43] van de Pavert SA. Lymphoid Tissue inducer (LTi) cell ontogeny and functioning in embryo and adult. *Biomed J* 2021 Apr;44(2):123–132.
- [44] Shi FD, Ljunggren HG, La Cava A, et al. Organ-specific features of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 2011;11(10):658–671.
- [45] Nixon BG, Chou C, Krishna C, et al. Cytotoxic granzyme C–expressing ILC1s contribute to antitumor immunity and neonatal autoimmunity. *Sci Immunol* 2022 Apr 8;7(70):eabi8642.
- [46] Kansler ER, Dadi S, Krishna C, et al. Cytotoxic innate lymphoid cells sense cancer cell-expressed interleukin-15 to suppress human and murine malignancies. *Nat Immunol* 2022 Jun;23(6):904–915.
- [47] Riggan L, Freud AG, O’Sullivan TE. True detective: unraveling group 1 innate lymphocyte heterogeneity. *Trends Immunol* 2019 Oct;40(10):909–921.
- [48] Seillet C, Brossay L, Vivier E. Natural killers or ILC1s? That is the question. *Curr Opin Immunol* 2021 Feb;68:48.
- [49] McFarland AP, Yalin A, Wang SY, et al. Multi-tissue single-cell analysis deconstructs the complex programs of mouse natural killer and type 1 innate lymphoid cells in tissues and circulation. *Immunity* 2021 Jun 8;54(6):1320–1337.e4.
- [50] Crinier A, Milpied P, Escalière B, et al. High-dimensional single-cell analysis identifies organ-specific signatures and conserved NK cell subsets in humans and mice. *Immunity* 2018 Nov 20;49(5):971–986.e5.
- [51] Krämer B, Nalin AP, Ma F, et al. Single-cell RNA sequencing identifies a population of human liver-type ILC1s. *Cell Rep* 2023 Jan 31;42(1):111937.
- [52] Zhang JM. *An J. Cytokines, inflammation and pain. Int Anesthesiol Clin* 2007;45(2):27–37.
- [53] Marçais A, Viel S, Grau M, et al. Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. *Front Immunol [Internet]* 2013 Dec 12;4. 450.1–14. [cited 2023 Mar 30]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00450>.
- [54] Cepero-Donates Y, Lacraz G, Ghobadi F, et al. Interleukin-15-mediated inflammation promotes non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine* 2016 Jun 1;82:102–111.
- [55] Dudek M, Pfister D, Donakonda S, et al. Auto-aggressive CXCR6+ CD8 T cells cause liver immune pathology in NASH. *Nature* 2021 Apr;592(7854):444–449.
- [56] Wang F, Zhang X, Liu W, et al. Activated natural killer cell promotes nonalcoholic steatohepatitis through mediating JAK/STAT pathway. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2022 Jan 1;13(1):257–274.
- [57] Tosello-Trampont AC, Krueger P, Narayanan S, et al. NKp46+ NK cells attenuate metabolism-induced hepatic fibrosis by regulating macrophage activation. *Hepatol Baltim Md* 2016 Mar;63(3):799–812.
- [58] Cook RT. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system—a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22(9):1927–1942.
- [59] Jerrells TR. Immunodeficiency associated with ethanol abuse. *Adv Exp Med Biol* 1991;288:229–236.
- [60] Støy S, Dige A, Sandahl TD, et al. Cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells display impaired cytotoxic functions and reduced activation in patients with alcoholic hepatitis. *Am J Physiol-gastrointest Liver Physiol* 2015 Feb 15;308(4):G269–G276.
- [61] Perney P, Portalès P, Corbeau P, et al. Specific alteration of peripheral cytotoxic cell perforin expression in alcoholic patients: a possible role in alcohol-related diseases. *Alcohol Clin Exp Res* 2003 Nov;27(11):1825–1830.
- [62] Laso FJ, Madruga JI, Giron JA, et al. Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not active ethanol consumption. *Hepatology* 1997;25(5):1096–1100.
- [63] Li F, Cook RT, Alber C, et al. Ethanol and natural killer cells. II. Stimulation of human natural killer activity by ethanol in vitro. *Alcohol Clin Exp Res* 1997 Sep;21(6):981–987.
- [64] Pan H, Sun R, Jaruga B, et al. Chronic ethanol consumption inhibits hepatic natural killer cell activity and accelerates murine cytomegalovirus-induced hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2006 Oct 1;30:1615–1623.
- [65] Jeong WI, Park O, Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon- γ contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008 Jan 1;134(1):248–258.
- [66] Zhang F, Little A, Zhang H. Chronic alcohol consumption inhibits peripheral NK cell development and maturation by decreasing the availability of IL-15. *J Leukoc Biol* 2017 Apr;101(4):1015–1027.
- [67] Zhang H, Meadows GG. Chronic alcohol consumption perturbs the balance between thymus-derived and bone marrow-derived natural killer cells in the spleen. *J Leukoc Biol* 2008 Jan 1;83(1):41–47.
- [68] Zhang H, Meadows GG. Exogenous IL-15 in combination with IL-15 α rescues natural killer cells from apoptosis induced by chronic alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 2009 Mar;33(3):419–427.
- [69] Cheng C, Zhang Q, Li Y, et al. Interplay between liver type 1 innate lymphoid cells and NK cells drives the development of alcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2022 Sep 27;15(1):261–274.
- [70] Brestoff JR, Kim BS, Saenz SA, et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* 2015 Mar 12;519(7542):242–246.
- [71] Lee MW, Odegaard JI, Mukundan L, et al. Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* 2015 Jan 15;160(1):74–87.
- [72] Wang GX, Zhao XY, Meng ZX, et al. The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuating hepatic lipogenesis. *Nat Med* 2014 Dec;20(12):1436.
- [73] Blondin DP, Tingelstad HC, Noll C, et al. Dietary fatty acid metabolism of brown adipose tissue in cold-acclimated men. *Nat Commun [Internet]* 2017 Jan 30;8. 14146.1–9. [cited 2023 Feb 22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5290270/>.
- [74] Ahmed BA, Ong FJ, Barra NG, et al. Lower brown adipose tissue activity is associated with non-alcoholic fatty liver disease but not changes in the gut microbiota. *Cell Rep Med* 2021 Sep 14;2(9):100397.
- [75] Wibmer AG, Becher T, Eljalby M, et al. Brown adipose tissue is associated with healthier body fat distribution and metabolic benefits independent of regional adiposity. *Cel Rep Med* 2021 Jul 7;2(7):100332.
- [76] Gonzalez-Polo V, Pucci-Molineris M, Cervera V, et al. Group 2 innate lymphoid cells exhibit progressively higher levels of activation during worsening of liver fibrosis. *Ann Hepatol* 2019 Mar 1;18(2):366–372.
- [77] Cella M, Fuchs A, Vermi W, et al. A human NK cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 2009 Feb 5;457(7230):722–725.
- [78] Cupedo T, Crellin NK, Papazian N, et al. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17–producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer–like cells. *Nat Immunol* 2009 Jan;10(1):66–74.
- [79] Yang L, Zhang Y, Wang L, et al. Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22. *J Hepatol* 2010 Aug 1;53(2):339–347.
- [80] Wang X, Ota N, Manzanillo P, et al. Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature* 2014 Oct;514(7521):237–241.
- [81] Hamaguchi M, Okamura T, Fukuda T, et al. Group 3 innate lymphoid cells protect steatohepatitis from high-fat diet induced toxicity. *Front Immunol* 2021 Mar 15;12:648754.

- [82] Hwang S, He Y, Xiang X, et al. Interleukin-22 ameliorates neutrophil-driven nonalcoholic steatohepatitis through multiple targets. *Hepatology* 2020 Aug;72(2):412–429.
- [83] Hendrikx T, Duan Y, Wang Y, et al. Bacteria engineered to produce IL-22 in intestine induce expression of REG3G to reduce ethanol-induced liver disease in mice. *Gut* 2019 Aug 1;68(8):1504–1515.
- [84] Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* 2014 Mar;14(3):181–194.
- [85] Gur C, Doron S, Kfir-Erenfeld S, et al. NKp46-mediated killing of human and mouse hepatic stellate cells attenuates liver fibrosis. *Gut* 2012 Jun 1;61(6):885–893.
- [86] Radaeva S, Sun R, Jaruga B, et al. 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* 2006 Feb 1;130(2):435–452.
- [87] Jeong WI, Park O, Radaeva S, et al. STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology* 2006;44(6):1441–1451.
- [88] Fan Y, Zhang W, Wei H, et al. Hepatic NK cells attenuate fibrosis progression of non-alcoholic steatohepatitis in dependent of CXCL10-mediated recruitment. *Liver Int* 2020;40(3):598–608.
- [89] Muhanna N, Tair LA, Doron S, et al. Amelioration of hepatic fibrosis by NK cell activation. *Gut* 2011 Jan 1;60(1):90–98.
- [90] Cai X, Wang J, Wang J, et al. Intercellular crosstalk of hepatic stellate cells in liver fibrosis: new insights into therapy. *Pharmacol Res* 2020 May 1;155:104720.
- [91] Vivier E, Tomasello E, Baratin M, et al. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008 May;9(5):503–510.
- [92] Tosello-Trampont A, Surette FA, Ewald SE, et al. Immunoregulatory role of NK cells in tissue inflammation and regeneration. *Front Immunol* 2017 Mar 20;8:301.
- [93] Luci C, Vieira E, Perchet T, et al. Natural killer cells and type 1 innate lymphoid cells are new actors in non-alcoholic fatty liver disease. *Front Immunol* 2019 May 28;10:1192.
- [94] Gao Y, Liu Y, Yang M, et al. IL-33 treatment attenuated diet-induced hepatic steatosis but aggravated hepatic fibrosis. *Oncotarget* 2016 Jun 7;7(23):33649–33661.
- [95] McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity* 2013 Aug 22;39(2):357–371.
- [96] Kong X, Feng D, Wang H, et al. Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis. *Hepatology* 2012 Sep;56(3):1150–1159.
- [97] Wang S, Li J, Wu S, et al. Type 3 innate lymphoid cell: a new player in liver fibrosis progression. *Clin Sci* 2018 Dec 13;132(24):2565–2582.
- [98] Raabe J, Kaiser KM, ToVinh M, et al. Identification and characterization of a hepatic IL-13-producing ILC3-like population potentially involved in liver fibrosis. *Hepatology* 2023 Sep;78(3):787.
- [99] Jacquilot N, Seillet C, Vivier E, et al. Innate lymphoid cells and cancer. *Nat Immunol* 2022 Mar;23(3):371–379.
- [100] Chiossone L, Dumas PY, Vienne M, et al. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol* 2018 Nov;18(11):671–688.
- [101] Cai L, Zhang Z, Zhou L, et al. Functional impairment in circulating and intrahepatic NK cells and relative mechanism in hepatocellular carcinoma patients. *Clin Immunol* 2008 Dec 1;129(3):428–437.
- [102] Mantovani S, Oliviero B, Lombardi A, et al. Deficient natural killer cell NKp30-mediated function and altered NCR3 splice variants in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2019;69(3):1165–1179.
- [103] Wu Y, Kuang DM, Pan WD, et al. Monocyte/macrophage-elicited natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma is mediated by CD48/2B4 interactions. *Hepatology* 2013;57(3):1107–1116.
- [104] Hoechst B, Voigtlaender T, Ormandy L, et al. Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology* 2009 Sep;50(3):799–807.
- [105] Li T, Yang Y, Hua X, et al. Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and Ido. *Cancer Lett* 2012 May 28;318(2):154–161.
- [106] Zhang QF, Yin WW, Xia Y, et al. Liver-infiltrating CD11b-CD27- NK subsets account for NK-cell dysfunction in patients with hepatocellular carcinoma and are associated with tumor progression. *Cell Mol Immunol* 2017 Oct;14(10):819–829.
- [107] Yu W, He J, Wang F, et al. NR4A1 mediates NK-cell dysfunction in hepatocellular carcinoma via the IFN- γ /p-STAT1/IRF1 pathway. *Immunology* 2023 May;169(1):69–82.
- [108] Müller NC, Romagnani C. To kill or not to kill – the role of the tumor microenvironment in shaping group 1 ILC functions. *Semin Immunol* 2022 Nov;61–64:101670.
- [109] Dadi S, Chhangawala S, Whitlock BM, et al. Cancer immunosurveillance by tissue-resident innate lymphoid cells and innate-like T cells. *Cell* 2016 Jan 28;164(3):365–377.
- [110] Ducimetière L, Lucchiari G, Litscher G, et al. Conventional NK cells and tissue-resident ILC1s join forces to control liver metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021 Jul 6;118(27):e2026271118.
- [111] Gao Y, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Bald T, et al. Tumor immunoevasion by the conversion of effector NK cells into type 1 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2017 Sep;18(9):1004–1015.
- [112] Dituri F, Mancarella S, Cigliano A, et al. TGF- β as multifaceted orchestrator in HCC progression: signaling, EMT, immune microenvironment, and novel therapeutic perspectives. *Semin Liver Dis* 2019 Feb;39(1):53–69.
- [113] Heinrich B, Gertz EM, Schäffer AA, et al. The tumor microenvironment shapes innate lymphoid cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Gut* 2022 Jun;71(6):1161–1175.
- [114] Xu X, Ye L, Zhang Q, et al. Group-2 innate lymphoid cells promote HCC progression through CXCL2-neutrophil-induced immunosuppression. *Hepatology* 2021;74(5):2526–2543.
- [115] Zhao J, Chen X, Herjan T, et al. The role of interleukin-17 in tumor development and progression. *J Exp Med* 2019 Nov 14;217(1):e20190297.
- [116] Liu Y, Song Y, Lin D, et al. NCR- group 3 innate lymphoid cells orchestrate IL-23/IL-17 axis to promote hepatocellular carcinoma development. *EBioMedicine* 2019 Mar 1;41:333–344.
- [117] Jiang R, Tan Z, Deng L, et al. Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology* 2011;54(3):900–909.
- [118] Park O, Wang H, Weng H, et al. In vivo consequences of liver-specific interleukin-22 expression: implications for human liver disease progression. *Hepatology* 2011 Jul;54(1):252–261.
- [119] Tacke F, Puengel T, Loomba R, et al. An integrated view of anti-inflammatory and antifibrotic targets for the treatment of NASH. *J Hepatology* 2023 Aug 1;79(2):552–566.
- [120] Chiossone L, Vivier E. Bringing natural killer cells to the clinic. *J Exp Med* 2022 Sep 6;219(10):e20220830.
- [121] Alnaggar M, Lin M, Mesmar A, et al. Allogenic natural killer cell immunotherapy combined with irreversible electroporation for stage IV hepatocellular carcinoma: survival outcome. *Cell Physiol Biochem* 2018 Aug 9;48(5):1882–1893.
- [122] Lin M, Liang S, Wang X, et al. Cryoablation combined with allogenic natural killer cell immunotherapy improves the curative effect in patients with advanced hepatocellular cancer. *Oncotarget* 2017 May 11;8(47):81967–81977.
- [123] Yu M, Luo H, Fan M, et al. Development of GPC3-specific chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Mol Ther* 2018 Feb 7;26(2):366–378.
- [124] Tseng H, Xiong W, Badeti S, et al. Efficacy of anti-CD147 chimeric antigen receptors targeting hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 2020 Sep 23;11(1):4810.
- [125] Liu B, Liu ZZ, Zhou ML, et al. Development of c-MET-specific chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells with cytotoxic effects on human liver cancer HepG2 cells. *Mol Med Rep* 2019 Sep;20(3):2823–2831.
- [126] Wang Z, Guo L, Song Y, et al. Augmented anti-tumor activity of NK-92 cells expressing chimeric receptors of TGF- β R II and NKG2D. *Cancer Immunol Immunother* 2017 Apr 1;66(4):537–548.
- [127] Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985 Dec 5;313(23):1485–1492.
- [128] Hsu EJ, Cao X, Moon B, et al. A cytokine receptor-masked IL2 prodrug selectively activates tumor-infiltrating lymphocytes for potent anti-tumor therapy. *Nat Commun* 2021 May 13;12(1):2768.
- [129] Easom NJW, Stegmann KA, Swadling L, et al. IL-15 overcomes hepatocellular carcinoma-induced NK cell dysfunction. *Front Immunol* 2018 May 9;9:1009.
- [130] Demaria O, Gauthier L, Debroas G, et al. Natural killer cell engagers in cancer immunotherapy: next generation of immuno-oncology treatments. *Eur J Immunol* 2021;51(8):1934–1942.

DISCUSSION

Il est désormais bien établi que l'inflammation chronique et l'activation des cellules immunitaires innées sont des acteurs essentiels de la MASLD. De plus en plus de preuves indiquent que les cellules innées lymphoïdes (ILC), et en particulier les cellules NK et les ILC1, jouent un rôle important dans la pathogenèse de la stéatohépatite (Bourinet et al., 2024; Luci et al., 2019). Dans le but de mieux appréhender le rôle de ces cellules au cours de la MASH, nous avons étudié la contribution de la glycoprotéine de surface CD44 dans la régulation de leurs fonctions. Cette protéine ayant été identifiée par le laboratoire comme un acteur clé dans la régulation de l'inflammation hépatique au cours de la MASH.

La contribution des cellules NK et des ILC1 dans les complications hépatiques associées à la MASLD.

Dans la première partie de notre étude, nous avons évalué la contribution des ILC NKp46⁺ dans un modèle murin de stéatohépatite métabolique sur des souris nourries pendant 4 semaines avec un régime déficient en choline et en méthionine (MCDD). Nous avons notamment mis en évidence que le développement et la progression de la MASLD étaient positivement corrélés au nombre d'ILC NKp46⁺ hépatiques. Par ailleurs, nous avons également constaté que les souris nourries avec un MCDD présentent un nombre de cellules NK hépatiques augmenté au détriment du nombre d'ILC1. Cette observation concorde avec l'étude de Tosello-Tramont (Tosello-Tramont et al., 2016) mais également avec celle plus récente de Fan *et al.* qui rapporte une augmentation des cellules NK dans le foie après 2 et 8 semaines de MCDD (Fan et al., 2020). Cette augmentation du nombre de cellules NK au niveau du foie s'explique notamment par leur recrutement depuis la circulation. En effet, au cours de l'inflammation hépatique, un certain nombre de médiateurs, sécrétés par les différents acteurs intrahépatiques, favorisent le recrutement leucocytaire, dont celui des cellules NK. C'est notamment le cas de la chimiokine CXCL10 qui se voit décrit comme un médiateur clé dans le recrutement des cellules NK par l'intermédiaire de son récepteur CXCR3 dont l'expression génique et protéique est augmentée au cours de la MASH induite par MCDD (Fan et al., 2020). Par ailleurs, cette même étude a renforcé le rôle que possède l'axe CXCL10-CXCR3 dans l'augmentation du nombre de cellules NK au niveau du foie, au détriment d'une prolifération *in situ* des cellules (diminution de l'expression de Ki67). Ce résultat est en accord avec notre étude au cours de laquelle nous avons

observé une diminution de l'expression de Ki67 sur les cellules NK du foie de souris nourries 4 semaines avec le MCDD.

Par ailleurs, il a également été montré dans le foie de souris nourries avec un régime riche en graisses (HFD) une augmentation de l'expression des chimiokines *Ccl2*, *Cxcl10* et *Ccl5*, connues pour être impliquées dans le recrutement des cellules NK (Cepero-Donates et al., 2016). Cependant, ces augmentations n'ont pas été observées dans le foie de souris déficientes en IL-15 et nourries avec un HFD ce qui suggère que la signalisation par l'IL-15 régule à la hausse l'expression des chimiokines impliquées dans le recrutement des cellules NK dans un environnement de MASLD. De plus, dans cette même étude le nombre de cellules NK dans le foie est diminué chez les souris déficientes en IL-15 par rapport aux souris du groupe contrôle. Bien que seulement corrélatifs, ces résultats suggèrent tout de même que l'IL-15 affecterait considérablement la biologie des cellules NK, y compris leur recrutement par l'intermédiaire de chimiokines notamment sécrétées par les hépatocytes au cours de la MASLD. De manière intéressante, nous avons montré une augmentation de l'expression génique de l'*Il15* dans les foies de nos souris contrôles nourries durant 4 semaines avec un MCDD par rapport à nos souris sous régime contrôle (CD). Ce résultat pourrait donc en partie expliquer l'implication de l'IL-15 dans l'augmentation du nombre de cellules NK que nous observons en favorisant notamment leur recrutement hépatique. Par la suite, nous avons constaté que le nombre de cellules NK et les caractéristiques de la MASLD (souffrance hépatocyttaire, stéatose et foci inflammatoires) étaient positivement corrélés, ce qui nous permet de suggérer que les cellules NK participent activement à la progression des complications hépatiques au cours de la MASLD. Afin de valider ces observations, nous avons utilisé un modèle murin dépourvu exclusivement de cellules NK dans un contexte de stéatohépatite métabolique (*NKp46^{iCre}Eomes^{flox/flox}*). Les résultats préliminaires obtenus ont permis de valider notre hypothèse en mettant notamment en évidence une diminution de la stéatose, des triglycérides hépatiques, de l'inflammation et de la fibrose chez les souris dépourvues de cellules NK après 4 semaines de MCDD. Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec l'étude de Wang *et al.* où l'utilisation de souris *Nfil3-KO*, permettant d'éliminer les cellules NK tout en conservant les ILC1, ont montré une réduction de la stéatose, de l'inflammation et des lésions hépatiques dans des régimes inducteurs de MASH (MCDD et HFD) (Wang et al., 2022). Par ailleurs, l'utilisation d'un anticorps neutralisant les cellules NK et les ILC1 (PK136) chez des souris nourries au MCDD a également permis de réduire les complications hépatiques liées à la MASLD. Cette seconde approche consistant à utiliser l'anticorps neutralisant (PK136), ne permet pas d'étudier uniquement l'impact des cellules NK sur la progression de la MASLD puisque les ILC1 se

voient également déplétées, au même titre que les lymphocytes NKT sont impactés à des moindres degrés. Cependant, l'utilisation de cet anticorps neutralisant a uniquement été associé à une MASH induite par MCDD et sachant que le nombre d'ILC1 est fortement diminué au profit du nombre de cellules NK dans ce modèle, les résultats qu'ils obtiennent permettent tout de même de s'affranchir de la contribution des ILC1. Il en est de même pour l'étude de Tosello-Tramont *et al.* qui utilise un modèle de déplétion des ILC NKp46⁺ par injection de toxine diphtérique chez des souris nourries sous MCDD. Dans ce modèle les cellules NK et les ILC1 sont donc par conséquent toutes deux déplétées. Cependant comme une perte des ILC1 est déjà observée sous MCDD, les résultats obtenus renvoient donc au rôle des cellules NK dans le maintien d'un environnement inflammatoire au cours de la MASH et qui limite par conséquent la progression vers un stade de fibrose (Tosello-Tramont *et al.*, 2016). Des expériences supplémentaires basées sur l'étude de la prolifération ou bien des différents types de mort cellulaire devront être menées afin de comprendre d'où provient cette importante diminution des ILC1 résidentes du foie après MCDD. Une explication pourrait être une plus grande sensibilité des ILC1 à l'apoptose ou à un autre type de mort cellulaire au cours de l'inflammation hépatique (Dodard *et al.*, 2020). De plus, il se pourrait que ce phénomène soit potentiellement dépendant du régime utilisé ou du stade de la pathologie. En effet, après 24 semaines de régime Western Diet, nous avons mis en évidence une augmentation du nombre de cellules NK dans le foie mais également du nombre d'ILC1. Actuellement, nous ne sommes pas en mesure d'apporter clairement une explication sur cette augmentation du nombre d'ILC1. Cependant, une étude publiée par Cuff *et al.* a révélé que chez des souris nourries pendant 24 semaines avec un régime HFD, les cellules NK cytotoxiques se convertissaient en un phénotype ILC1-like moins cytotoxique (Cuff *et al.*, 2019). De par certaines similarités que peuvent présenter les régimes HFD et Western Diet (2 régimes obésogènes) il est donc probable que l'augmentation du nombre ILC1 observé dans notre modèle soit possiblement due à un début de conversion des cellules NK en ILC1-like. Des études supplémentaires de caractérisation des ILC1 seraient donc intéressantes afin d'affiner plus clairement leur phénotype. Une étude plus récente a montré dans un modèle murin d'HFD d'ischémie-reperfusion (HFD-IRI) une augmentation significative de la population d'ILC1 hépatiques alors que la population de cellules NK reste inchangée par rapport aux souris ND (régime normal)-IRI. De plus, la génération d'un double KO *Rag1^{-/-}T-bet^{-/-}* leur a permis d'obtenir un modèle murin n'ayant plus de lymphocytes T, B et d'ILC1 exprimant *T-bet*, mais qui possède toujours les cellules NK exprimant *Eomes*. Ces souris soumises à un HFD-IRI ont montré une protection significative contre les lésions hépatiques par rapport aux souris *Rag1^{-/-}* simples, suggérant que les ILC1

exprimant T-bet jouent un rôle important dans l'IRI hépatique sous des conditions stéatotiques. En effet, ces ILC1 HFD-IRI seraient capables de produire des quantités plus importantes IFN γ et de TNF α que les ILC1 provenant de souris ND-IRI (Kang et al., 2022). Même si le rôle des ILC1 au cours de la MASLD reste encore à être clairement déterminé, leur implication dans la stéatohépatite alcoolique a cependant été récemment étudiée. En effet, chez des souris soumises à une alimentation chronique d'éthanol, le nombre d'ILC1 est augmenté suite à l'apoptose des cellules NK. Ces ILC1 hépatiques favoriseraient le développement et l'aggravation de la stéatohépatite alcoolique par la sécrétion d'IL-17 (Cheng et al., 2022). Bien que la majorité des études ainsi que nos résultats mettent clairement en évidence un rôle essentiel des cellules NK dans le développement des complications hépatiques liées à la MASLD, l'implication des ILC1 n'est pas à exclure pour autant et reste à approfondir.

Le rôle de CD44 sur la prolifération des cellules NK.

Après avoir montré la contribution des cellules NK au cours des complications hépatiques et plus particulièrement au cours de la MASH, nous avons cherché à mieux appréhender leur rôle exact ainsi que la régulation de leurs fonctions. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la glycoprotéine de surface CD44, exprimée majoritairement par les cellules immunitaires et dont l'équipe a démontré son rôle clé dans l'inflammation hépatique au cours de la MASLD (Patouraux et al., 2017).

De manière intéressante, la première observation que nous avons faite chez nos souris invalidées pour CD44 au sein des ILC NKp46⁺ a mis en évidence une diminution du nombre de cellules NK et d'ILC1 à l'état basal et après 4 semaines de MCDD comparée aux souris contrôles. Afin de comprendre l'origine de cette réduction du nombre d'ILC NKp46⁺ lors de l'inactivation de CD44 nous avons étudié les capacités de l'infiltration et de prolifération des cellules NK de nos souris sous régime standard ou MCDD. Bien que la capacité de recrutement des cellules NK invalidées pour CD44 semble inchangée (aucune modification de l'expression du récepteur CXCR3), la capacité proliférative est significativement diminuée (diminution de l'expression de Ki67) chez ces mêmes souris. Ainsi la glycoprotéine de surface CD44 semblerait jouer un rôle important dans la prolifération des cellules NK. Ce résultat n'est pas particulièrement surprenant puisque plusieurs études ont révélé un lien étroit entre l'expression de CD44 et les capacités de prolifération des cellules cancéreuses. C'est notamment le cas de l'étude menée par Kolliopoulos *et al.* qui a mis en avant l'importance de CD44 dans la

progression du glioblastome multiforme (GBM), notamment en influençant la croissance cellulaire et la prévention de la sénescence. Dans le but d'explorer le rôle de CD44 dans la progression du GBM, les auteurs ont procédé à l'édition du gène *CD44* par CRISPR/Cas9 au sein de lignées humaines U251MG (lignée hautement proliférative et invasive du GMB) afin de générer des cellules CD44-KO. La déplétion de CD44 dans les cellules U251MG a diminué significativement leur capacité proliférative et induit leur sénescence. Par ailleurs, l'analyse par séquençage de l'ARN des cellules U251MG a révélé une dépendance de CD44 pour les signatures de gènes liés à la voie glycolytique et à la transition de phase G2 vers M (soit l'entrée en mitose) (Kolliopoulos et al., 2022). De plus, il a également été montré que CD44 était capable de réguler la prolifération des cellules endothéliales microvasculaires par l'intermédiaire de la modulation de l'expression de CD31 (PECAM-1) et de la VE-cadhérine (Tsuneki and Madri, 2014). Cependant, les résultats présentés dans cette étude vont dans le sens inverse de nos résultats mais également de l'étude que je viens précédemment d'énoncer. En effet, l'invalidation de CD44 dans les cellules endothéliales entraîne une prolifération accrue de ces cellules suite à une diminution de la VE-cadhérine, corrélée à une augmentation de l'expression de la survivine et à l'activation de la voie Hippo favorisant la croissance cellulaire. Bien que les résultats de ces deux études semblent s'opposer le lien qu'établit CD44 dans la régulation de la prolifération cellulaire (qu'elle soit positive ou négative) reste évident.

Il est bien connu que les cellules NK subissent un changement métabolique afin d'alimenter leur prolifération et leur activation suite à une infection et/ou dans un contexte tumoral. Récemment, il a été montré qu'en cas d'infection/inflammation, les cellules NK de la rate régulent à la hausse l'expression du récepteur 2 du TNF (TNFR2), qui est associée à une augmentation de la prolifération, de l'activité métabolique et de la fonction effectrice (Khan et al., 2023). L'expression du TNFR2 par les cellules NK peut être notamment induite par l'IL-18, augmentant ainsi leur sensibilité au TNF α . Ainsi la signalisation TNF α -TNFR2 régulerait à la hausse l'expression du récepteur IL-2R α et le transporteur aux nutriments Slc7a5 dans les cellules NK. Par ailleurs, l'analyse transcriptomique a révélé des niveaux d'expression significativement réduits des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire et la prolifération dans les cellules NK de souris TNFR2-KO (Khan et al., 2023). Par ailleurs, l'étude de Zhao *et al.* publiée en 2017, avait déjà clairement mis en évidence le lien entre le récepteur TNFR2 et l'expression du marqueur de prolifération Ki67 dans les tissus de patients atteints de cancer colorectal (Zhao et al., 2017). Bien qu'encore très hypothétique, il se pourrait qu'il existe alors

un lien entre la glycoprotéine CD44 et le récepteur TNFR2 qui régulerait la prolifération des cellules NK.

Le rôle de CD44 sur le métabolisme et les fonctions effectrices des cellules NK au cours de la MASLD.

Dans la suite de notre étude visant à comprendre la contribution de CD44 dans le rôle des ILC NKp46⁺ au cours de la MASLD, nous avons mis en évidence que les souris invalidées spécifiquement pour CD44 dans ces cellules et nourries avec des régimes inducteurs de MASH (MCDD et Western Diet) présentaient une augmentation des complications hépatiques liées à l'obésité : souffrance hépatique (transaminases), inflammation (marqueurs inflammatoires) et fibrose (marqueurs de la fibrogenèse et dépôts de collagène). Afin de comprendre l'origine de la progression de la MASLD dans notre modèle, nous nous sommes intéressés au profil métabolique et fonctionnel des cellules NK. De manière intéressante, nous avons montré qu'après 4 semaines de régime MCDD, les cellules NK hépatiques déficientes pour CD44 présentaient une capacité glycolytique ainsi qu'une capacité de sécrétion d'IFN γ significativement augmentées, comparées aux cellules NK de souris contrôles. Cependant, la capacité de dégranulation et par conséquent leur fonction de cytotoxicité ne semblent pas être modifiée par rapport aux cellules NK de souris contrôles. Ainsi, ces résultats suggèrent que ces cellules NK sont métaboliquement et fonctionnellement plus actives au stade de la MASH. L'augmentation du niveau d'activation des cellules NK invalidées pour CD44 et notamment la production accrue d'IFN γ , décrit comme potentialisateur de l'inflammation hépatique (Li et al., 2021; Tosello-Tramont et al., 2016), pourrait donc en partie être liée à l'aggravation des complications hépatiques au cours de la MASH. De plus, le dosage de l'IFN γ dans le foie total de souris *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* après 4 semaines de MCDD est également augmenté. Cependant, les résultats que nous avons obtenu ne sont pas en adéquation avec l'étude récemment publiée par Michelet *et al.* qui a mis en évidence une reprogrammation métabolique des cellules NK dans l'obésité qui limite leur réponse effectrice (Michelet et al., 2018). En effet, dans cette étude les cellules NK de rate de souris obèses (HFD pendant 8 à 13 semaines) et les cellules NK provenant du sang de patients atteints d'obésité seraient capables d'accumuler les lipides de manière robuste, ce qui induirait une activation des PPAR (PPAR α/δ) dans les cellules NK et une « paralysie complète » (modification importante de leur capacité à répondre) de leur métabolisme cellulaire et de leur fonction. La paralysie du métabolisme cellulaire serait

notamment due à une altération de la voie mTOR dans des cas d'obésité. En 2009, une première étude avait déjà rapporté l'existence d'une altération des cellules NK dans une cohorte de patients souffrant gravement d'obésité sévère (Lynch et al., 2009). De plus, en 2017, il a également été suggéré que la stimulation chronique des cellules NK durant l'obésité (étude sur cohorte de patients atteints d'obésité) pouvait conduire à une incapacité à répondre normalement et à éliminer les cellules cibles (Viel et al., 2017). Dans notre cas, nous avons constaté que ce soit pour les cellules NK hépatiques de souris contrôles ou de souris invalidées spécifiquement pour CD44, une augmentation de leur capacité glycolytique et non une « paralysie » de leur métabolisme après 4 semaines de MCDD. Par ailleurs, les fonctions effectrices ne sont pas non plus impactées. Afin d'expliquer ces différences, il serait intéressant d'étudier le métabolisme des cellules NK hépatiques de souris nourries avec le Western Diet, qui est un régime obésogène, et donc plus proche de l'HFD utilisé dans l'étude de Michelet *et al.* Ensuite, les résultats de leur étude s'axent sur des cellules NK de rate de souris obèses et des cellules NK circulantes de patients atteints d'obésité, mais aucun résultat ne porte sur les cellules NK hépatiques de souris obèses. Il serait donc intéressant de pouvoir comparer les profils métaboliques des cellules NK hépatiques, circulantes et provenant de la rate de souris dans un contexte d'obésité commun afin d'identifier de possibles variations. Par ailleurs, il serait également intéressant d'étudier non seulement la captation d'acides gras par les cellules NK (expression de CD36) mais également la voie des PPAR dans nos modèles murins précédemment cités.

En parallèle, nous avons mené des expériences *ex vivo* afin d'approfondir un peu plus les résultats obtenus sur le métabolisme et les fonctions effectrices des cellules NK déficientes pour CD44. Les cellules NK hépatiques ont été stimulées de 3 manières différentes : une stimulation cytokinique (IL-12/IL-18) ou par activation du récepteur activateur NK1.1 ou une stimulation avec du LPS. Nous nous sommes tout d'abord rendu compte que la stimulation IL-12/IL-18 induisait une augmentation de la glycolyse et de la capacité glycolytique maximale des cellules NK contrôles par rapport aux cellules NK invalidées pour CD44. Cependant, bien que les niveaux d'expression des gènes du métabolisme (*Myc*, *Slc7a5*) et des fonctions effectrices soient augmentés après une stimulation IL-12/IL-18, aucune différence n'a été observée entre les deux génotypes. Ensuite, l'utilisation d'un anticorps anti-NK1.1 a révélé des résultats plus cohérents à ceux obtenus *in vivo* après MCDD puisque les cellules NK invalidées pour CD44 présentent une augmentation de leur activité glycolytique par rapport aux cellules NK contrôles. De manière intéressante, nous avons cependant constaté que l'expression des gènes du

métabolisme (*Myc*, *Slc7a5*) était diminuée chez les cellules NK invalidées pour CD44 par rapport aux cellules NK contrôles. D'un point de vue fonctionnel, la stimulation du récepteur activateur NK1.1 entraîne une diminution des capacités cytokiniques mais une augmentation des capacités cytotoxiques des cellules NK invalidées pour CD44. Ces résultats s'opposent à ceux obtenus *in vivo*, où la cytotoxicité des cellules NK des souris invalidées pour CD44 sous MCDD n'est pas augmentée par rapport aux cellules NK de souris contrôles, à la différence de l'IFN γ qui est sécrété en plus grande quantité. Nous émettons donc l'hypothèse qu'après une stimulation du récepteur NK1.1, les cellules NK invalidées pour CD44 possèdent une activité cytotoxique augmentée liée à une augmentation de leur capacité glycolytique mais de manière indépendante de l'OXPPOS, de cMyc et de *Slc7a5*. Actuellement, la majorité des études sur le métabolisme des cellules NK menée *ex vivo* se basent sur des stimulations cytokiniques (IL2, IL-12, IL-18), alors que peu de données existent après une activation du récepteur NK1.1. En effet, il est par exemple bien décrit que le facteur de transcription cMyc est essentiel pour les réponses métaboliques et fonctionnelles des cellules NK induites par l'IL2/IL-12 chez la souris et que le système glutamine/*Slc7a5* permet de soutenir l'expression de cMyc (Khameneh et al., 2023; Loftus et al., 2018). Une seconde étude a mis en avant le rôle essentiel des facteurs de transcription *Srebp1* dans la reprogrammation métabolique des cellules NK induite par les cytokines, indépendamment de leur rôle conventionnel dans le contrôle de la synthèse des lipides. En effet, *Srebp* participe notamment à l'augmentation de la glycolyse et de l'OXPPOS et favorise la configuration métabolique où le glucose est métabolisé en citrate cytosolique (navette citrate-malate) (Assmann et al., 2017). Cependant, les résultats que nous avons obtenus révèlent de grandes divergences métaboliques en fonction de la stimulation utilisée (cytokinique ou activation récepteur activateur). En effet, une stimulation cytokinique entraîne une augmentation nette de la glycolyse et de l'OXPPOS alors qu'une stimulation NK1.1 peine à activer la voie glycolytique et diminue sa phosphorylation oxydative. Il se peut donc que le métabolisme des cellules NK soit modulé de manière complètement différente en fonction de la stimulation utilisée et il est donc normal que l'invalidation de CD44 au sein des cellules NK puisse moduler différemment les voies métaboliques entre une stimulation NK1.1 et IL-12/IL-18. Nos résultats sur le métabolisme et la fonctionnalité des cellules NK se basent sur des temps longs de stimulation (18h-20h) tandis que les études sur les comportements métaboliques après stimulation par des récepteurs activateurs ont été faits sur des temps courts (6h). Une étude a notamment montré que la stimulation à court terme de cellules NK murines via les récepteurs Ly49D ou NK1.1 ne module pas la production d'ATP, d'OXPPOS ou la glycolyse (Keppel et al., 2015). De plus, contrairement à la stimulation cytokinique, l'inhibition de l'OXPPOS ou

de la glycolyse lors d'une courte stimulation réduit considérablement la production d'IFN γ . La cytotoxicité des cellules NK est quant à elle affectée uniquement après inhibition de la glycolyse mais pas de l'OXPHOS après stimulation via le récepteur Ly49D (Mah et al., 2017; Mah-Som et al., 2021). A la différence de chez la souris, les cellules NK humaines régulent à la hausse leur capacité glycolytique et leur OXPHOS lorsqu'elles sont activées par NKG2D et CD16 pendant une courte période (4-6h). Cependant, l'activité cytokinique des cellules NK humaines reste dépendante de la glycolyse et de l'OXPHOS, tandis que l'activité cytotoxique est uniquement dépendante de la glycolyse, comme pour les cellules NK de souris (Wang et al., 2020). Il est donc clair que l'activité métabolique des cellules NK diffère en fonction des différentes voies d'activation. Par ailleurs, les mécanismes de régulation des voies métaboliques et par conséquent la régulation des réponses effectrices des cellules NK après activation par les récepteurs activateurs restent clairement à élucider, notamment sur des temps plus longs. Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que CD44 module certaines fonctions effectrices des cellules NK et leur métabolisme quel que soit le type de stimulation.

Au vu de la divergence des résultats que nous avons obtenus *ex vivo* avec les stimulations IL-12/IL-18 et NK1.1 par rapport à ceux obtenus *in vivo*, nous avons décidé de regarder l'effet du LPS sur le métabolisme et les réponses effectrices de nos cellules NK. En effet, nous avons mis en évidence une augmentation de la perméabilité intestinale et du niveau d'immunoglobulines dirigées contre LPS chez nos souris *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{fllox/fllox}* après 4 semaines de régime MCDD. L'augmentation de ces deux paramètres suggère une translocation des produits bactériens de l'intestin jusqu'au foie, ce qui justifierait que le LPS puisse jouer un rôle dans l'activation des cellules NK. De plus, il est bien établi que le LPS joue un rôle indirect dans l'activation des cellules NK. En effet, la stimulation des cellules dendritiques ou des macrophages par le récepteur TLR4 entraîne la production de cytokines (IL-12 et IL-18), et l'expression en surface de ligands stimulant les récepteurs activateurs (NKG2D) des cellules NK, conduisant à leur activation (Gerosa et al., 2002; Walzer et al., 2005). Plus récemment lors de lésions aiguës hépatiques, il a été montré que les LSEC du foie participaient également à l'activation des cellules NK d'une manière indirecte en réponse au LPS. En effet, les LSEC activées par le LPS produisent des chimiokines telles que CXCL10 et CCL2 qui vont recruter les cellules NK et favoriser leur activation (Papaioannou et al., 2023). En ce qui concerne le rôle direct du LPS sur les cellules NK, des premières études ont soutenu cette hypothèse en démontrant que les cellules NK humaines exprimaient les récepteurs au LPS : TLR2, TLR4 (Lauzon et al., 2006; Mian et al., 2010; Saikh et al., 2003). Par la suite, l'étude de Kanevskiy *et al.* a validé cette

hypothèse en montrant dans des fractions purifiées de cellules NK humaines que le LPS avait un effet stimulant sur la production d'IFN γ , tandis que la capacité de dégranulation des cellules NK en réponse aux cellules cibles K562 était diminuée. Le niveau d'expression extracellulaire de TLR4 n'est pas augmenté et l'utilisation d'un anticorps bloquant le TLR4 n'entraîne aucune diminution de la production d'IFN γ induite par le LPS, suggérant alors l'existence d'un mécanisme distinct de la signalisation médiée par le TLR4 dans les cellules NK activées au LPS (Kanevskiy et al., 2013). Une étude plus récente de Kanevskiy, a montré l'importance de la présence de l'antigène O dans la structure du LPS dans la production d'IFN γ par les cellules NK (Kanevskiy et al., 2019). Les résultats que nous avons mis en évidence révèlent qu'après une stimulation au LPS, les cellules NK invalidées pour CD44 possèdent à la fois une augmentation de leur capacité glycolytique, une diminution de la dépendance mitochondriale, une augmentation de l'expression génique et protéique d'IFN γ , ainsi qu'une augmentation de l'expression génique de *Csf2* et *Il6*. Ainsi, après une activation au LPS, les cellules NK invalidées pour CD44 se voient métaboliquement et fonctionnellement (activité cytokinique) plus actives que les cellules NK contrôles. Par ailleurs, ces résultats présentent une certaine concordance avec ceux obtenus *in vivo* et suggèrent que CD44 jouerait un rôle dans la régulation de cette voie d'activation des cellules NK par le LPS qui pourrait être indépendante du TLR4, tout en régulant le métabolisme. De plus, il serait intéressant d'approfondir les mécanismes de régulation des voies métaboliques après activation des cellules NK par le LPS par l'étude des régulateurs clés du métabolisme (mTOR, cMyc, Slc7a5, Srebp).

L'inflammation hépatique au cours de la MASLD maintenue par le dialogue cellules NK/Macrophages et cellules NK/Hépatocytes.

- *Cellules NK/Macrophages*

L'infiltration des macrophages hépatiques a été démontrée dans des modèles alimentaires d'obésité et de stéatohépatite (HFD ou MCDD) et joue un rôle crucial dans la pathogenèse de la MASH (Lanthier et al., 2010; Patouraux et al., 2017; Tosello-Tramont et al., 2012). Dans notre étude, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression génique de marqueurs associés aux cellules myéloïdes (*cd11c*, *cd11b*, *ccl2*, *cd44*, *opn*) dans le foie des souris *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* nourries avec les régimes MCDD ou Western Diet. De plus, ces souris présentent également une augmentation du nombre et de la fréquence de macrophages pro-inflammatoires F4/80⁺ CD11b^{high} CD11c⁺ mais uniquement après un régime MCDD. Cette

augmentation de la population de macrophages pro-inflammatoires n'est pas retrouvée après 24 semaines de Western Diet mais est cependant présente à des temps plus courts de régime (10 semaines). 24 semaines de Western Diet représente un stade plus avancé de MASH-fibrosante proche des stades plus sévères (développement de nodules de bas grade). Ainsi, à 24 semaines l'environnement immunitaire peut potentiellement être différent de celui d'une stéatohépatite métabolique induite après seulement 10 semaines de Western Diet. Cette hypothèse permettrait en partie de justifier pourquoi cette augmentation de macrophages pro-inflammatoires n'est pas retrouvée chez les souris *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* après 24 semaines de Western Diet. Comme abordé dans l'introduction, on retrouve principalement deux populations de macrophages dans le foie : les cellules de Kupffer (KC) et les macrophages dérivés de monocytes de la moelle osseuse (MoMF). Actuellement, notre étude ne nous permet pas de caractériser précisément ces populations de macrophages. Il serait donc intéressant d'approfondir la caractérisation de nos populations de macrophages en utilisant d'autres marqueurs, notamment TIM4, CLEC4F (Scott et al., 2016), et CLEC2 plus récemment décrit (Tran et al., 2020). En effet, la combinaison TIM4 CLEC4F permet de distinguer les cellules de Kupffer résidentes (TIM4⁺ CLEC4F⁺), les KC en voie de devenir résidentes (TIM4⁻CLEC4F⁺) et enfin les macrophages recrutés et dérivés de monocytes de la moelle osseuse (TIM4⁻CLEC4F⁻) (Devisscher et al., 2017; Scott et al., 2016). De plus, l'étude récemment publiée par Remmerie *et al.* a mis en évidence une nouvelle sous-population de macrophages recrutés (LAM) distincte des cellules de Kupffer au cours de la stéatohépatite (régime occidental riche en graisses, en sucre et en cholestérol) et qui exprime l'ostéopontine (OPN), marqueur clé de la fibrose hépatique (Homme et souris) (Remmerie et al., 2020). Etant donné que l'OPN est un des ligands de CD44, il serait intéressant de regarder précisément de quelle manière est modulée cette population de macrophages (LAM) chez nos souris invalidées pour CD44 dans les ILC NKp46⁺ au cours de la MASH. Par ailleurs, au cours de ces dernières années, un grand nombre d'études n'ont cessé de découvrir et caractériser de nouvelles sous populations de macrophages/cellules de Kupffer dans le foie au cours de la MASLD (Blériot et al., 2021; Hendrikx et al., 2022; Seidman et al., 2020). C'est pourquoi, essayer de caractériser plus finement nos populations de macrophages dans notre modèle, nous permettrait de mieux comprendre les populations de macrophages avec lesquelles les ILC NKp46⁺ établissent un dialogue au cours de la MASH. Dans ce sens, les études de Tosello-Tramont et Fan ont notamment décrit que l'IFN γ produit par les cellules NK hépatiques régulait l'activation des macrophages pour freiner la progression de la MASH (Fan et al., 2020; Tosello-Tramont et al., 2016). De plus, la déficience en cellules NK et/ou ILC1 favorise le développement de la fibrose et l'acquisition de la part des macrophages d'un phénotype

favorisant le développement de la fibrose. Par ailleurs, le rôle de l'IFN γ dans l'activation des macrophages est déjà bien connu, notamment par l'induction de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Murray and Wynn, 2011). Cependant, le mécanisme lui-même est encore débattu, car il semblerait que ce soit plus spécifiquement un priming de l'IFN γ qui préparerait l'activation des macrophages. L'IFN γ induirait des changements internes au sein des macrophages, qui seraient responsables de la réponse inflammatoire robuste déclenchée par le ligand TLR lors de l'activation classique des macrophages (Chen and Ivashkiv, 2010; Wu et al., 2014). Il est donc possible que l'IFN γ produit en grande quantité par les cellules NK invalidées pour CD44 et qui présentent une réactivité importante au LPS, favorise le phénotype pro-inflammatoire des macrophages hépatiques que nous observons. Il est également important de préciser que nos souris *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* sous MCDD et Western Diet présentent également une augmentation de la fibrose. Nous n'avons cependant observé aucune différence de la balance macrophage pro-inflammatoire/macrophage anti-inflammatoire lorsque nous avons évalué l'expression des gènes qui y sont associés (*cd301*, *cd206*, *inos*, *arginase1*) (résultats non présentés). Cependant, nous avons montré qu'après traitement au LPS, les cellules NK invalidées pour CD44 voyaient l'expression de *Csf2* (codant pour GM-CSF) augmentée. Il a été démontré que les niveaux de GM-CSF sériques sont plus élevés chez les patients atteints du virus de l'hépatite C et présentant une fibrose hépatique plus importante. De plus, il a été démontré que le GM-CSF joue un rôle dans la conversion des monocytes en macrophages CD206, qui produisent du TNF α en réponse à des produits bactériens tels que le LPS (Tan-Garcia et al., 2020). Ainsi, il se pourrait que l'augmentation de la fibrose hépatique que nous observons soit la conséquence d'une conversion des monocytes en macrophages CD206⁺. Afin de valider ces différentes hypothèses, il serait donc très intéressant dans un premier temps d'incuber des macrophages dérivés de la moelle osseuse et/ou hépatiques avec le surnageant de cellules NK invalidées ou non pour CD44 et stimulées au LPS. Dans un second temps, les cellules NK directement isolées d'un foie MASH (MCDD et Western Diet) pourront également être mis en co-culture avec des macrophages. Ces expériences nous permettront de mieux comprendre le dialogue cellules NK/macrophages. Enfin, les travaux de Patouraux *et al.* ont montré que l'invalidation de CD44, par utilisation de souris CD44-KO général ou par l'intermédiaire d'un anticorps anti-CD44, entraîne une correction partielle de la MASH avec une diminution de la fréquence des macrophages et des neutrophiles au niveau du foie (Patouraux et al., 2017). Ainsi, un ciblage globale de CD44 serait donc protecteur, à la différence du ciblage de CD44 spécifiquement au niveau des cellules NKp46⁺ qui aggraverait

la pathologie. Il est important de prendre en considération que les macrophages hépatiques exprimant CD44 sont plus abondants que les ILC CD44⁺ NKp46⁺ hépatiques et sont donc plus affectés dans les souris CD44 KO général utilisées dans l'étude de Patouraux *et al.* Nous pensons également que notre étude actuelle fournit des informations sur une régulation plus fine de l'inflammation hépatique en ciblant une population spécifique.

- *Cellules NK/Hépatocytes*

Les hépatocytes représentent 80% des cellules du foie et jouent un rôle majeur dans le développement de la MASH. Nous avons donc jugé pertinent d'observer l'effet de l'activation des cellules NK par le LPS sur le comportement d'hépatocytes isolés, d'autant plus qu'actuellement, peu voir quasiment aucune étude n'a étudié le dialogue cellules NK/hépatocytes. De manière intéressante, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression génique des marqueurs du stress oxydatif, ainsi que de l'expression génique et protéique de cytokines inflammatoires après stimulation des hépatocytes isolés avec les surnageants de cellules NK invalidées pour CD44 et traitées au LPS. Nos résultats concordent avec ceux de l'étude de Wang *et al.* qui a notamment mis en évidence que les cellules NK isolées d'un foie MASH présentaient une sécrétion importante de cytokines pro-inflammatoires capables d'activer la voie NF- κ B et par conséquent de favoriser la mise en place d'une réponse inflammatoire par les hépatocytes. De plus, l'activation de la voie JAK-STAT au sein de ces mêmes hépatocytes semble liée à l'augmentation des gènes du stress oxydatif (Wang et al., 2020). Ainsi l'aggravation de la MASH que nous avons observé chez nos souris invalidées pour CD44 au sein des ILC NKp46⁺ nourries au MCDD ou Western Diet pourrait s'expliquer par une plus grande réactivité des cellules NK au LPS et l'existence d'une boucle inflammatoire majeure entre ces cellules NK et les hépatocytes.

La contribution de l'intestin au cours de la MASH.

Des souris nourries avec des régimes HFD et MCDD ont montré une augmentation de leur perméabilité intestinale liée à une perte d'expression des protéines de jonctions serrées telles que ZO-1, JAM-A et la Claudine-1. Ces altérations de la barrière intestinale favorisent alors le développement d'une MASH plus grave que chez des souris contrôles (Mouries et al., 2019; Rahman et al., 2016). De plus, il est bien décrit que l'inflammation ainsi que l'altération des fonctions de la barrière intestinale induites par une dysbiose sont des mécanismes clés

impliqués dans l'augmentation de la perméabilité intestinale et la fuite de produits bactériens tels que le LPS (Luck et al., 2015; Schroeder et al., 2018; Verdam et al., 2011). Dans notre étude, nous avons montré une réduction importante de l'expression de la protéine de jonction ZO-1 dans l'iléon de nos souris invalidées pour CD44 nourries au MCDD pendant 2 et 4 semaines. Par ailleurs, nous avons également détecté dans le sérum de ces souris une augmentation d'immunoglobulines dirigées contre le LPS. Ces résultats suggèrent que les composants bactériens de l'intestin ont traversé la barrière intestinale et atteints la circulation sanguine, puis le foie où ils participent à l'aggravation de la MASH que nous observons chez les souris *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}*. Afin d'approfondir ces résultats, il serait intéressant dans un premier temps de les confirmer chez nos souris *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* après un Western Diet, puis dans un second temps de les compléter par d'autres tests de perméabilité intestinale en réalisant notamment un test de gavage orale avec du Dextran-FITC. Enfin l'expression d'autres protéines de jonction pourrait être également étudiée comme l'occludine par des approches d'immunohistochimie et Western Blot. De plus, nous constatons également que les souris *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* sous régime standard présentent dans la circulation un niveau plus élevé d'anticorps anti-LPS par rapport aux souris contrôles également sous régime standard. Bien qu'aucune perte de l'expression de ZO-1 ne soit cependant observée sur les coupes d'iléon, on peut tout de même se poser la question de savoir si l'invalidation de CD44 au sein des ILC NKp46⁺ n'a pas tout de même un effet à l'état basal sur la barrière intestinale qui serait ensuite amplifié avec le MCDD. De plus, comme la dysbiose favorise l'altération de la barrière intestinale au cours de la MASLD, il serait donc intéressant de pouvoir étudier l'implication du microbiote dans la séquence d'évènements qui conduit à l'augmentation des lésions hépatiques chez nos souris par séquençage des phyla bactériens. Sur le long terme la réalisation de transplantation d'homogénats fécaux provenant de nos souris invalidées ou non pour CD44 après MCDD ou Western Diet à des souris « germ free » (dépourvues de germes), ainsi que le traitement de nos souris avec des antibiotiques à large spectre pourrait être envisagés. A plus court terme le dosage de l'ADN16S hépatique sur les échantillons de foie de souris MCDD et Western Diet pourrait être une première approche qui validerait notre hypothèse d'une augmentation de la translocation de produits bactériens jusqu'au foie. De plus, des modèles précliniques de MASH/MASLD et des études sur les patients atteints de MASH ont mis en évidence que le dysfonctionnement de l'intestin contribuait de manière déterminante à l'activation immunitaire soutenue dans le foie, aggravant ainsi la maladie (Boursier et al., 2016; Cheng et al., 2018). Les résultats de ces études viennent clairement renforcer nos observations. Actuellement, nous n'avons pas étudié l'inflammation intestinale au cours de la MASH. Bien

qu'il serait intéressant de savoir si les cellules NK intestinales invalidées pour CD44 possèderaient également la capacité de potentialiser l'inflammation au niveau de l'intestin durant la MASH, leur isolation depuis cet organe présente des difficultés techniques (nombre de cellules récoltées, qualité de la préparation) qui seraient intéressantes d'améliorer afin de répondre à cette problématique. Cependant, des études visant à moduler l'inflammation intestinale ont notamment eu recours à l'utilisation du composé 5-ASA (5-Aminosalicicylic acid) (Huang et al., 2022; Wada et al., 2023). Ce composé est une molécule anti-inflammatoire spécifique de l'intestin et médicament clé de la colite ulcéreuse. Bien que le mécanisme d'action du 5-ASA reste incertain, l'hypothèse que ce composé altère le microbiote intestinal afin de favoriser son effet anti-inflammatoire est envisagée. De plus, l'étude de Luck *et al.* a mis en évidence après le traitement des souris HFD avec le 5-ASA, une réduction de la perméabilité intestinale et de l'endotoxémie, ainsi qu'une diminution de l'inflammation du tissu adipeux viscéral (Luck et al., 2015). L'utilisation de ce composé sur nos souris invalidées ou non pour CD44 et nourries au MCDD et/ou Western Diet, nous permettrait de regarder l'effet de la modulation de l'inflammation intestinale au niveau de l'intestin et au niveau hépatique (inflammation, fibroses, stéatose...).

Les ILC NKp46⁺ qui comprennent les cellules NK, les ILC1 et une sous-population d'ILC3 ont été identifiées dans la muqueuse intestinale de souris (épithélium et lamina propria) et sont impliquées dans l'inflammation de l'intestin (Fuchs et al., 2013; Tang et al., 2016). Dans notre étude, nous avons montré que les souris *Ncr1^{iCre/+}Cd44^{flox/flox}* présentaient une diminution du nombre de cellules NK et d'ILC1, mais pas d'ILC3 après un MCDD. Il est possible que cette réduction de cellules NK et d'ILC1 soient due à un défaut de leur capacité de prolifération comme nous l'avons observé au niveau hépatique, mais qui n'impacterait pas les ILC3 NKp46⁺. Les ILC3 ont été décrites comme ayant un rôle protecteur chez les souris développant un syndrome métabolique associé à l'obésité et à la stéatohépatite par l'intermédiaire de l'IL-22 (Hamaguchi et al., 2021; Wang et al., 2014; Yang et al., 2010). Cependant, les altérations que nous avons observé au niveau de la barrière intestinale (intégrité, perméabilité, fuite du LPS), chez les souris déficientes pour CD44 dans les ILC NKp46⁺, suggèrent que le rôle protecteur des ILC3 NKp46⁺ pourrait être contrebalancé par un rôle plus délétère des cellules NK/ILC1. Afin de mieux comprendre la contribution de chacune des populations d'ILC NKp46⁺ au niveau de l'intestin au cours de la MASH, il serait intéressant de regarder la production de cytokines telles que l'IL-22, l'IL-17, l'IFN γ et le TNF α . En effet, l'IL-22 préserve la muqueuse intestinale, réduit l'inflammation chronique et inverse l'hyperglycémie et l'insulino-résistance

et régule le métabolisme des lipides dans le foie et le tissu adipeux (Wang et al., 2014). Il est donc possible que l'invalidation de CD44 dans les ILC3 NKp46⁺ est entraînée l'altération de la production d'IL-22 au cours de la MASLD. De plus, Vonarbourg *et al.* ont été parmi les premiers à mettre en évidence au niveau de l'intestin la capacité des ILC3 NKp46⁺ (CCR6⁻) à se convertir en ILC1 productrice d'IFN γ (Vonarbourg et al., 2010). L'IFN γ est impliqué dans l'inflammation associée aux colites ainsi que dans les réponses aux pathogènes (Fuchs et al., 2013; Klose et al., 2014) et pourrait donc avoir un rôle néfaste dans l'intestin au cours de la MASH, favorisant ainsi l'altération de la barrière intestinale. Enfin, ces résultats pourraient être approfondis à l'aide d'approches de séquençage de l'ARNm afin de mieux caractériser les populations d'ILC NKp46⁺ ainsi que leur rôle dans l'intestin au cours de la MASH.

Les cellules NK et les ILC1 hépatiques humaines au cours de la MASLD.

Les études menées chez l'animal nous offrent la possibilité de mieux appréhender et disséquer les pathologies qui se développent chez l'Homme en abordant un aspect plus mécanistique et non simplement descriptif. Cependant, l'accès à des cohortes reste pour nous un outil essentiel afin de pouvoir confronter et renforcer les résultats obtenus avec nos modèles murins. Nous avons donc cherché à examiner la relation entre l'expression hépatique de marqueurs des cellules NK/ILC1 et la MASLD dans des biopsies hépatiques de patients souffrant d'obésité sévère et ayant subi une chirurgie bariatrique. La corrélation de l'*Eomesodermine* avec la stéatose hépatique, l'expression génique de *Cd44* et l'expression du marqueur macrophagique *Cd68* suggère que les cellules NK pourraient contribuer au développement de complications hépatiques chez les patients atteints d'obésité. Bien que le facteur de transcription *Eomesodermine* puisse contribuer à définir les cellules NK hépatiques chez l'Homme, nous sommes bien conscients qu'il n'est pas représentatif à 100% de cette population cellulaire puisque non seulement les lymphocytes T CD8 l'expriment (Llaó-Cid et al., 2021; Pearce et al., 2003), mais également car la caractérisation des cellules NK hépatiques humaines se révèle plus complexe (Marotel et al., 2016). En effet, les cellules NK hépatiques humaines ont été divisées en deux sous-populations sur la base de l'expression du récepteur CXCR6 : les cellules NK T-bet^{hi}Eomes^{lo}CXCR6⁻ et les cellules NK T-bet^{lo}Eomes^{hi}CXCR6⁺ (Stegmann et al., 2016). Cette population de cellules NK CD56^{bright} CXCR6⁺ présente des similitudes avec les ILC1 hépatiques de souris qui expriment aussi CXCR6. Par ailleurs, une seconde étude a caractérisé une autre sous-population de cellules NK hépatiques n'exprimant pas le facteur de transcription *Eomesodermine*, mais exprimant T-bet et le marqueur CD49a (Marquardt et al., 2015). Ainsi,

des marqueurs plus spécifiques des cellules NK et/ou des ILC1 devront donc être utilisés afin de valider nos corrélations comme : *Ncr1* (NKP46) ou *Klrk1* (NKG2D). Par ailleurs, bien qu'il soit extrêmement compliqué d'avoir accès à des échantillons de tissu frais, cet outil permettrait tout de même d'étudier dans le détail le rôle, le métabolisme et la fonctionnalité des cellules NK et des ILC1 humaines au niveau hépatique au cours de la MASLD. C'est notamment la raison pour laquelle, la majorité des études basées chez l'Homme sont réalisées à partir d'échantillons de sang périphérique et par conséquent sur les cellules NK. Cependant à ce jour, la présence, la régulation et la fonction des cellules NK au cours de la MASLD restent controversées. En effet, plusieurs études ont montré que la fréquence de circulation des cellules NK chez les patients atteints d'obésité serait plus faible que chez des personnes saines et que la fréquence réduite des cellules NK serait associée à une activité dysfonctionnelle (Michelet et al., 2018; O'Shea et al., 2010; Viel et al., 2017). Plus récemment, l'étude de Diedrich *et al.* a montré que les patients atteints de MASLD présentaient une fréquence plus faible de cellules NK CD56^{dim}, ainsi qu'une expression plus faible du récepteur activateur NKG2D par rapport aux individus sains (Diedrich et al., 2020). En contradiction apparente, d'autres études n'ont décrit aucun changement dans la fréquence ou le nombre absolu de cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} en circulation chez les patients obèses, MASH ou MASLD (Stiglund et al., 2019; Theurich et al., 2017). Ces contradictions pourraient s'expliquer par une composition différente des cohortes de patients utilisées, obèses versus obèses morbides, et donc avec un environnement métabolique différent. De plus, la fibrose hépatique semblerait être un déterminant clé de l'activation des cellules NK circulantes, puisque les cellules NK CD56^{dim} seraient plus cytotoxiques chez les patients ayant un faible score de fibrose, tandis que la capacité de destruction des cellules tumorales des cellules CD56^{dim} serait significativement réduite chez les patients présentant des scores de fibrose élevés (Amer et al., 2018). Au niveau hépatique, l'étude de Cuff *et al.* a trouvé des fréquences de cellules NK comparables dans le foie de patients atteints d'obésité et minces, mais avec une capacité cytotoxique réduite et qui serait négativement corrélée à la gravité de la maladie (Cuff et al., 2019). Enfin, Kahraman *et al.* ont constaté que la fibrose hépatique chez les patients atteints de MASH était associée à une présence accrue de cellules NK hépatiques et une expression élevée de NKG2D. Chez les patients atteints de MASLD, le nombre de cellules NK hépatiques était réduit (Kahraman et al., 2010). D'un point de vue métabolique, certaines études ont mis en évidence le rôle du microenvironnement sur l'activation des cellules NK et par conséquent leur métabolisme en modulant notamment l'expression des transporteurs aux nutriments. Par exemple, les cellules NK CD56^{bright} hépatiques ont une capacité réduite d'absorption du glucose, mais plus élevée

pour les acides aminés, car elles expriment de faibles niveaux de GLUT1 mais des niveaux augmentés de CD98 (sous-unité du récepteur aux nutriments Slc7a5). En revanche, les cellules NK CD56^{bright} dans le sang, expriment des niveaux élevés de GLUT1 et des niveaux réduits de CD71 et CD98 (Salzberger et al., 2018). Dans le même sens, l'étude de Michelet *et al.*, plusieurs fois abordée dans ce manuscrit, a mis en évidence une « paralysie » du métabolisme et une perte des capacités cytotoxiques des cellules NK circulantes chez les patients obèses (Michelet et al., 2018). Enfin, une caractérisation des différentes sous-populations d'ILC dans les tissus chez l'Homme est un axe prometteur. Dans ce sens, l'étude menée par Heinrich *et al.* qui, par des techniques de séquençage de l'ARN unicellulaire et de cytométrie en flux des ILC hépatiques de patients atteints de carcinome hépatocellulaire, a permis d'identifier des cellules de type NK issues du tissu hépatique non tumoral ayant perdu leur profil cytotoxique lors de leur transition vers un stade ILC1-like ou ILC3-like au sein de la tumeur. Ainsi la composition de la tumeur en ILC est dépendante d'un gradient de cytokines capables de moduler la plasticité des ILC (Heinrich et al., 2022). Ces approches de séquençage de l'ARN unicellulaire, sont des techniques qui pourront permettre de mieux caractériser phénotypiquement et fonctionnellement les ILC humaines au cours de la MASH/MASLD.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos différents travaux nous ont permis de mettre en lumière l'implication des ILC NKp46⁺ dans le développement des complications hépatiques de la MASLD et plus particulièrement au cours de la MASH. De plus, notre focus sur la glycoprotéine de surface CD44 au sein des ILC NKp46⁺ nous a permis de mieux comprendre et d'identifier son rôle dans la modulation du comportement des ILC NKp46⁺ et plus particulièrement des cellules NK dans la MASLD.

Nos souris déficientes pour CD44 au sein des ILC NKp46⁺ et nourries sous MCDD et Western Diet ont présenté une diminution du nombre de cellules NK et d'ILC1 hépatiques. Il s'est également révélé que les cellules NK hépatiques de souris invalidées spécifiquement pour CD44 et nourries au MCDD présentaient également une diminution de l'expression du facteur de prolifération Ki67, laissant penser que CD44 serait capable de réguler/moduler les capacités prolifératives des ILC NKp46⁺. Cette observation mérite cependant d'être renforcée par l'étude de la prolifération des cellules NK et des ILC1 également après un Western Diet.

L'aggravation de la souffrance hépatocytaire, de l'inflammation et de la fibrose hépatique chez les souris invalidées spécifiquement pour CD44 après un MCDD ou un Western Diet, nous a poussé à nous intéresser au rôle de CD44 dans la régulation des fonctions des ILC NKp46⁺.

Après l'étude du métabolisme et des fonctions effectrices de cellules NK provenant de souris spécifiquement invalidées pour CD44 et nourries au MCDD, une augmentation de leur capacité glycolytique associée à une augmentation de la sécrétion d'IFN γ a été observée. Ainsi, l'invalidation de la glycoprotéine de surface CD44 au sein des cellules NK semble booster leur capacité glycolytique ainsi que leur activité cytokinique au cours de la MASH, laissant penser que CD44 régule le métabolisme et les fonctions effectrices des cellules NK. Il serait donc intéressant de regarder si nous obtenons également ces résultats après un Western Diet, mais aussi d'étudier l'influence de CD44 sur le métabolisme et les réponses effectrices des ILC1.

Nos expériences menées *ex vivo* sur les cellules NK invalidées pour CD44, ont révélé qu'après une stimulation au LPS, leur capacité glycolytique et leur activité cytokinique étaient augmentées par rapport à celles des cellules NK contrôles. Ce profil métabolique et fonctionnel, obtenu en réponse au LPS, est extrêmement semblable à celui que nous avons observé sous MCDD, ce qui laisse penser que les cellules NK hépatiques invalidées pour CD44 seraient préférentiellement activées par le LPS au cours de la MASH. De plus, les souris invalidées pour

CD44 au sein des ILC NKp46⁺ présentent une augmentation de la perméabilité intestinale et une augmentation du niveau circulant d'anticorps dirigés contre LPS. Il se pourrait donc que l'invalidation de CD44 au sein des ILC NKp46⁺ intestinales favorisent la translocation de produits bactériens intestinaux, comme le LPS, jusqu'au foie, entraînant par conséquent une suractivation des cellules NK hépatiques invalidées pour CD44. Cette théorie reste cependant à être renforcée par des études complémentaires et le mécanisme d'altération de la barrière intestinale chez les souris invalidées pour CD44 au sein des ILC NKp46⁺ reste à être approfondis.

Nous avons également mis en évidence l'existence d'un dialogue entre les cellules NK et les hépatocytes qui serait notamment responsable du maintien de l'état inflammatoire au cours de la MASH. De plus, les cellules NK, par l'intermédiaire de l'IFN γ , potentialiserait également l'activation et/ou le recrutement de macrophages inflammatoires au cours de la MASH. Des études supplémentaires, sont cependant nécessaires afin de caractériser plus précisément la population de macrophages concernée, mais également afin de déterminer son origine (macrophages résidents ou recrutés).

Enfin, nos études chez l'Homme sont encore à un stade préliminaire. Dans le futur, un accès à des échantillons de tissu frais (sang, foie) des patients de nos différentes cohortes nous permettrait de mieux comprendre l'implication et le rôle des cellules NK/ILC1 dans les maladies chroniques du foie associées à l'obésité.

Mes travaux de thèse suggèrent donc que CD44 est un régulateur d'une partie des fonctions des cellules NK hépatiques et son absence au sein de ces cellules contribue au développement de la maladie (**Figure 22**). Notre étude permet de mieux comprendre la physiopathologie de la MASLD et suggère que le ciblage des fonctions des cellules NK représente un axe d'étude pour le développement d'approches thérapeutiques pour prévenir/traiter les complications hépatiques associées à l'obésité.

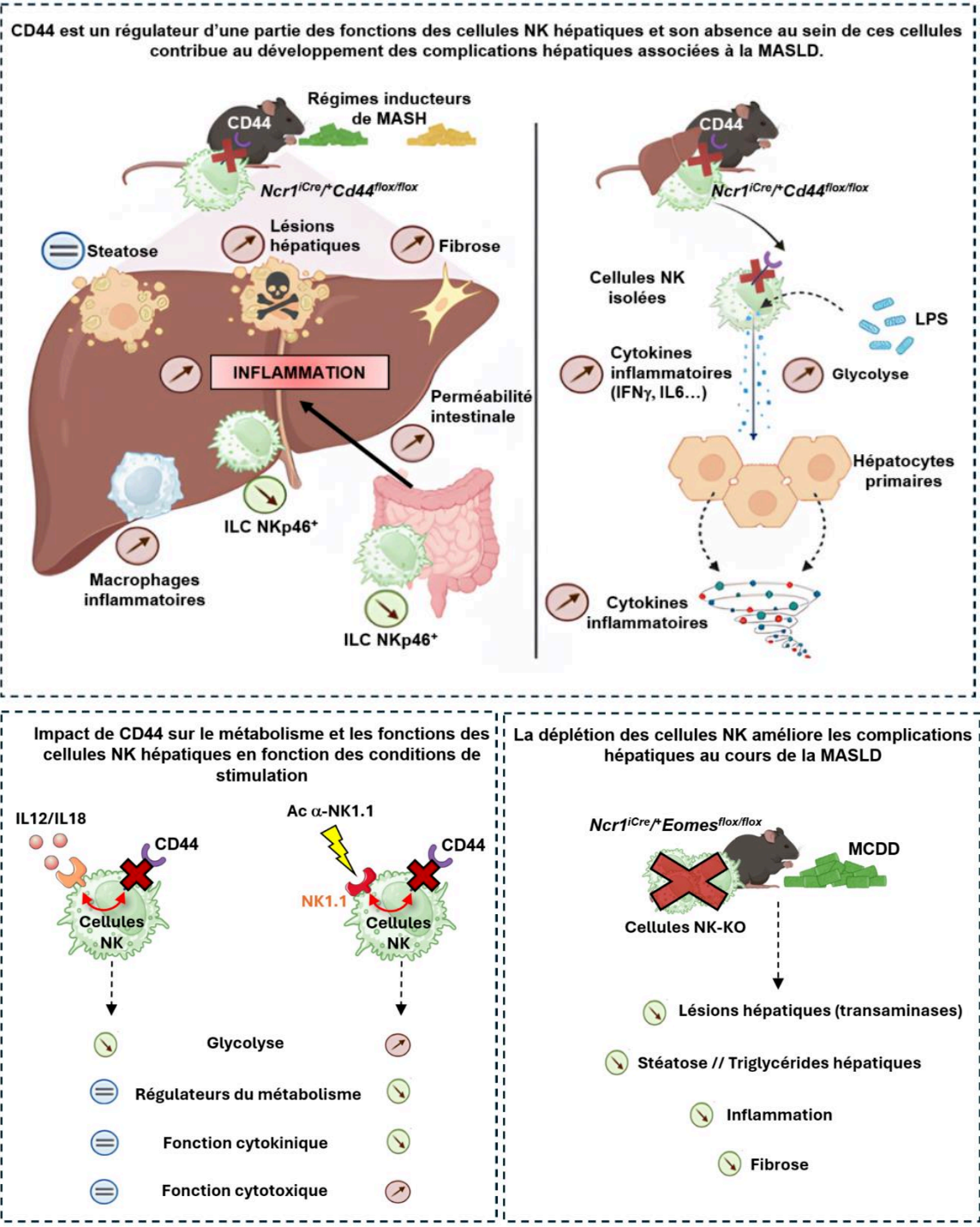


Figure 22. Schéma bilan de mon projet de thèse.

REFERENCES

- Abdelmalek, M.F., 2021. Nonalcoholic fatty liver disease: another leap forward. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18, 85–86. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00406-0>
- Affo, S., Yu, L.-X., Schwabe, R.F., 2017. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Fibrosis in Liver Cancer. *Annu Rev Pathol* 12, 153–186. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100322>
- Agrati, C., Alonzi, T., De Santis, R., Castilletti, C., Abbate, I., Capobianchi, M.R., D’Offizi, G., Siepi, F., Fimia, G.M., Tripodi, M., Poccia, F., 2006. Activation of V γ 9V δ 2 T cells by non-peptidic antigens induces the inhibition of subgenomic HCV replication. *Int Immunol* 18, 11–18. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh337>
- Ahmed, B.A., Ong, F.J., Barra, N.G., Blondin, D.P., Gunn, E., Oreskovich, S.M., Szamosi, J.C., Syed, S.A., Hutchings, E.K., Konyer, N.B., Singh, N.P., Yabut, J.M., Desjardins, E.M., Anhê, F.F., Foley, K.P., Holloway, A.C., Noseworthy, M.D., Haman, F., Carpentier, A.C., Surette, M.G., Schertzer, J.D., Punthakee, Z., Steinberg, G.R., Morrison, K.M., 2021. Lower brown adipose tissue activity is associated with non-alcoholic fatty liver disease but not changes in the gut microbiota. *Cell Rep Med* 2, 100397. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100397>
- Aigner, E., Weiss, G., Datz, C., 2015. Dysregulation of iron and copper homeostasis in nonalcoholic fatty liver. *World Journal of Hepatology* 7, 177. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i2.177>
- Alon, R., Kassner, P.D., Carr, M.W., Finger, E.B., Hemler, M.E., Springer, T.A., 1995. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *Journal of Cell Biology* 128, 1243–1253. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.6.1243>
- Amer, J., Salhab, A., Nouredin, M., Doron, S., Abu-Tair, L., Ghantous, R., Mahamid, M., Safadi, R., 2018. Insulin signaling as a potential natural killer cell checkpoint in fatty liver disease. *Hepatol Commun* 2, 285–298. <https://doi.org/10.1002/hep4.1146>
- Amir, M., Zhao, E., Fontana, L., Rosenberg, H., Tanaka, K., Gao, G., Czaja, M.J., 2013. Inhibition of hepatocyte autophagy increases tumor necrosis factor-dependent liver injury by promoting caspase-8 activation. *Cell Death Differ* 20, 878–887. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.21>
- An, P., Wei, L.-L., Zhao, S., Sverdlov, D.Y., Vaid, K.A., Miyamoto, M., Kuramitsu, K., Lai, M., Popov, Y.V., 2020. Hepatocyte mitochondria-derived danger signals directly activate hepatic stellate cells and drive progression of liver fibrosis. *Nat Commun* 11, 2362. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16092-0>
- Andersen, B., Straarup, E.M., Heppner, K.M., Takahashi, D.L., Raffaele, V., Dissen, G.A., Lewandowski, K., Bödvarsdóttir, T.B., Raun, K., Grove, K.L., Kievit, P., 2018. FGF21 decreases body weight without reducing food intake or bone mineral density in high-fat fed obese rhesus macaque monkeys. *Int J Obes (Lond)* 42, 1151–1160. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0080-7>
- Anstee, Q.M., Castera, L., Loomba, R., 2022. Impact of non-invasive biomarkers on hepatology practice: Past, present and future. *Journal of Hepatology, Breakthroughs in Hepatology* 76, 1362–1378. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.03.026>
- Arthur, M.J.P., 2000. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 279, G245–G249. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.2.G245>
- Assmann, N., O’Brien, K.L., Donnelly, R.P., Dyck, L., Zaiatz-Bittencourt, V., Loftus, R.M., Heinrich, P., Oefner, P.J., Lynch, L., Gardiner, C.M., Dettmer, K., Finlay, D.K., 2017. Srebp-controlled glucose metabolism is essential for NK cell functional responses. *Nat Immunol* 18, 1197–1206. <https://doi.org/10.1038/ni.3838>
- Baaten, B., Tinoco, R., Bradley, L., 2012. Regulation of Antigen-Experienced T Cells: Lessons from the Quintessential Memory Marker CD44. *Front. Immunol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00023>

- Bähr, I., Spielmann, J., Quandt, D., Kielstein, H., 2020. Obesity-Associated Alterations of Natural Killer Cells and Immunosurveillance of Cancer. *Front Immunol* 11, 245. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00245>
- Bai, L., Vienne, M., Tang, L., Kerdiles, Y., Etiennot, M., Escalière, B., Galluso, J., Wei, H., Sun, R., Vivier, E., Peng, H., Tian, Z., 2021. Liver type 1 innate lymphoid cells develop locally via an interferon- γ -dependent loop. *Science* 371, eaba4177. <https://doi.org/10.1126/science.aba4177>
- Bando, J.K., Liang, H.-E., Locksley, R.M., 2015. Identification and distribution of developing innate lymphoid cells in the fetal mouse intestine. *Nat Immunol* 16, 153–160. <https://doi.org/10.1038/ni.3057>
- Barrow, F., Khan, S., Wang, H., Revelo, X.S., 2021. The Emerging Role of B Cells in the Pathogenesis of NAFLD. *Hepatology* 74, 2277–2286. <https://doi.org/10.1002/hep.31889>
- Beattie, L., Sawtell, A., Mann, J., Frame, T.C.M., Teal, B., de Labastida Rivera, F., Brown, N., Walwyn-Brown, K., Moore, J.W.J., MacDonald, S., Lim, E.-K., Dalton, J.E., Engwerda, C.R., MacDonald, K.P., Kaye, P.M., 2016. Bone marrow-derived and resident liver macrophages display unique transcriptomic signatures but similar biological functions. *J Hepatol* 65, 758–768. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.037>
- Bergheim, I., Weber, S., Vos, M., Krämer, S., Volynets, V., Kaserouni, S., McClain, C.J., Bischoff, S.C., 2008. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: Role of endotoxin. *Journal of Hepatology* 48, 983–992. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.01.035>
- Bernink, J.H., Peters, C.P., Munneke, M., te Velde, A.A., Meijer, S.L., Weijer, K., Hreggvidsdottir, H.S., Heinsbroek, S.E., Legrand, N., Buskens, C.J., Bemelman, W.A., Mjösberg, J.M., Spits, H., 2013. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol* 14, 221–229. <https://doi.org/10.1038/ni.2534>
- Berod, L., Friedrich, C., Nandan, A., Freitag, J., Hagemann, S., Harmrolfs, K., Sandouk, A., Hesse, C., Castro, C.N., Bähre, H., Tschirner, S.K., Gorinski, N., Gohmert, M., Mayer, C.T., Huehn, J., Ponimaskin, E., Abraham, W.-R., Müller, R., Lochner, M., Sparwasser, T., 2014. De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. *Nat Med* 20, 1327–1333. <https://doi.org/10.1038/nm.3704>
- Bertola, A., Bonnafous, S., Anty, R., Patouraux, S., Saint-Paul, M.-C., Iannelli, A., Gugenheim, J., Barr, J., Mato, J.M., Le Marchand-Brustel, Y., Tran, A., Gual, P., 2010. Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One* 5, e13577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013577>
- Bertola, A., Ciucci, T., Rousseau, D., Bourlier, V., Duffaut, C., Bonnafous, S., Blin-Wakkach, C., Anty, R., Iannelli, A., Gugenheim, J., Tran, A., Bouloumié, A., Gual, P., Wakkach, A., 2012. Identification of Adipose Tissue Dendritic Cells Correlated With Obesity-Associated Insulin-Resistance and Inducing Th17 Responses in Mice and Patients. *Diabetes* 61, 2238–2247. <https://doi.org/10.2337/db11-1274>
- Bertola, A., Deveaux, V., Bonnafous, S., Rousseau, D., Anty, R., Wakkach, A., Dahman, M., Tordjman, J., Clément, K., McQuaid, S.E., Frayn, K.N., Huet, P.-M., Gugenheim, J., Lotersztajn, S., Le Marchand-Brustel, Y., Tran, A., Gual, P., 2009. Elevated Expression of Osteopontin May Be Related to Adipose Tissue Macrophage Accumulation and Liver Steatosis in Morbid Obesity. *Diabetes* 58, 125–133. <https://doi.org/10.2337/db08-0400>
- Bhandari, S., Larsen, A.K., McCourt, P., Smedsrød, B., Sørensen, K.K., 2021. The Scavenger Function of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Health and Disease. *Front Physiol* 12, 757469. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.757469>
- Bhattacharjee, J., Kirby, M., Softic, S., Miles, L., Salazar-Gonzalez, R., Shivakumar, P., Kohli, R., 2017. Hepatic natural killer T-cell and CD8+ T-cell signatures in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Commun* 1, 299–310. <https://doi.org/10.1002/hep4.1041>
- Blériot, C., Barreby, E., Dunsmore, G., Ballaire, R., Chakarov, S., Ficht, X., De Simone, G., Andreatta, F., Fumagalli, V., Guo, W., Wan, G., Gessain, G., Khalilnezhad, A., Zhang, X.M., Ang, N., Chen, P., Morgantini, C., Azzimato, V., Kong, W.T., Liu, Z., Pai, R., Lum, J., Shihui, F., Low, I., Xu, C., Malleret, B., Kairi, M.F.M., Balachander, A., Cexus, O., Larbi, A., Lee, B., Newell, E.W., Ng, L.G., Phoo, W.W.,

- Sobota, R.M., Sharma, A., Howland, S.W., Chen, J., Bajenoff, M., Yvan-Charvet, L., Venteclef, N., Iannacone, M., Aouadi, M., Ginhoux, F., 2021. A subset of Kupffer cells regulates metabolism through the expression of CD36. *Immunity* 54, 2101-2116.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.08.006>
- Boivin, G., Faget, J., Ancey, P.-B., Gkasti, A., Mussard, J., Engblom, C., Pfirschke, C., Contat, C., Pascual, J., Vazquez, J., Bendriss-Vermare, N., Caux, C., Vozenin, M.-C., Pittet, M.J., Gunzer, M., Meylan, E., 2020. Durable and controlled depletion of neutrophils in mice. *Nat Commun* 11, 2762. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16596-9>
- Bollyky, P.L., Lord, J.D., Masewicz, S.A., Evanko, S.P., Buckner, J.H., Wight, T.N., Nepom, G.T., 2007. Cutting Edge: High Molecular Weight Hyaluronan Promotes the Suppressive Effects of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* 179, 744–747. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.744>
- Bostick, J.W., Zhou, L., 2016. Innate lymphoid cells in intestinal immunity and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 237–252. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2055-3>
- Boulenouar, S., Michelet, X., Duquette, D., Alvarez, D., Hogan, A.E., Dold, C., O'Connor, D., Stutte, S., Tavakkoli, A., Winters, D., Exley, M.A., O'Shea, D., Brenner, M.B., von Andrian, U., Lynch, L., 2017. Adipose Type One Innate Lymphoid Cells Regulate Macrophage Homeostasis through Targeted Cytotoxicity. *Immunity* 46, 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.008>
- Bourguignon, L.Y.W., Earle, C., Wong, G., Spevak, C.C., Krueger, K., 2012. Stem Cell Marker (Nanog) and Stat-3 Signaling Promote MicroRNA-21 Expression and Chemoresistance in Hyaluronan/CD44-activated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Oncogene* 31, 149. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.222>
- Bourguignon, L.Y.W., Peyrollier, K., Xia, W., Gilad, E., 2008. Hyaluronan-CD44 Interaction Activates Stem Cell Marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 Gene Expression, and Ankyrin-regulated Multidrug Efflux in Breast and Ovarian Tumor Cells. *J Biol Chem* 283, 17635–17651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800109200>
- Bourguignon, L.Y.W., Shiina, M., Li, J.-J., 2014. Hyaluronan-CD44 Interaction Promotes Oncogenic Signaling, microRNA Functions, Chemoresistance, and Radiation Resistance in Cancer Stem Cells Leading to Tumor Progression. *Advances in cancer research* 123, 255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800092-2.00010-1>
- Bourguignon, L.Y.W., Xia, W., Wong, G., 2009. Hyaluronan-mediated CD44 interaction with p300 and SIRT1 regulates beta-catenin signaling and NFkappaB-specific transcription activity leading to MDR1 and Bcl-xL gene expression and chemoresistance in breast tumor cells. *J Biol Chem* 284, 2657–2671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806708200>
- Bourinet, M., Anty, R., Gual, P., Luci, C., 2024. Roles of innate lymphoid cells in metabolic and alcohol-associated liver diseases. *JHEPReport* 6. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100962>
- Boursier, J., Mueller, O., Barret, M., Machado, M., Fizzanne, L., Araujo-Perez, F., Guy, C.D., Seed, P.C., Rawls, J.F., David, L.A., Hunault, G., Oberti, F., Calès, P., Diehl, A.M., 2016. The severity of NAFLD is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* 63, 764–775. <https://doi.org/10.1002/hep.28356>
- Boyman, O., Létourneau, S., Krieg, C., Sprent, J., 2009. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *European Journal of Immunology* 39, 2088–2094. <https://doi.org/10.1002/eji.200939444>
- Branković, M., Jovanović, I., Dukić, M., Radonjić, T., Oprić, S., Klačnja, S., Zdravković, M., 2022. Lipotoxicity as the Leading Cause of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Int J Mol Sci* 23, 5146. <https://doi.org/10.3390/ijms23095146>
- Bricard, G., Venkataswamy, M.M., Yu, K.O.A., Im, J.S., Ndonge, R.M., Howell, A.R., Veerapen, N., Illarionov, P.A., Besra, G.S., Li, Q., Chang, Y.-T., Porcelli, S.A., 2010. α -Galactosylceramide Analogs with Weak Agonist Activity for Human iNKT Cells Define New Candidate Anti-Inflammatory Agents. *PLoS One* 5, e14374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014374>
- Bril, F., Ortiz-Lopez, C., Lomonaco, R., Orsak, B., Freckleton, M., Chintapalli, K., Hardies, J., Lai, S., Solano, F., Tio, F., Cusi, K., 2015. Clinical value of liver ultrasound for the diagnosis of nonalcoholic fatty

- liver disease in overweight and obese patients. *Liver Int* 35, 2139–2146. <https://doi.org/10.1111/liv.12840>
- Brubaker, W.D., Crane, A., Johansson, J.U., Yen, K., Garfinkel, K., Mastroeni, D., Asok, P., Bradt, B., Sabbagh, M., Wallace, T.L., Glavis-Bloom, C., Tenner, A.J., Rogers, J., 2017. Peripheral complement interactions with amyloid β peptide: Erythrocyte clearance mechanisms. *Alzheimer's & Dementia* 13, 1397–1409. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.03.010>
- Bruzzi, S., Sutti, S., Giudici, G., Burlone, M.E., Ramavath, N.N., Toscani, A., Bozzola, C., Schneider, P., Morello, E., Parola, M., Pirisi, M., Albano, E., 2018. B2-Lymphocyte responses to oxidative stress-derived antigens contribute to the evolution of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Free Radical Biology and Medicine* 124, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.015>
- Burghardt, S., Erhardt, A., Claass, B., Huber, S., Adler, G., Jacobs, T., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S., Karimi, K., Tiegs, G., 2013. Hepatocytes Contribute to Immune Regulation in the Liver by Activation of the Notch Signaling Pathway in T Cells. *The Journal of Immunology* 191, 5574–5582. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300826>
- Cai, B., Dongiovanni, P., Corey, K.E., Wang, X., Shmarakov, I.O., Zheng, Z., Kasikara, C., Davra, V., Meroni, M., Chung, R.T., Rothlin, C., Schwabe, R.F., Blaner, W.S., Birge, R.B., Valenti, L., Tabas, I., 2020. Macrophage MerTK Promotes Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cell Metab* 31, 406–421.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.013>
- Cai, J., Zhang, X.-J., Li, H., 2019. The Role of Innate Immune Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 70, 1026–1037. <https://doi.org/10.1002/hep.30506>
- Cai, L., Zhang, Z., Zhou, L., Wang, H., Fu, J., Zhang, S., Shi, M., Zhang, H., Yang, Y., Wu, H., Tien, P., Wang, F.-S., 2008. Functional impairment in circulating and intrahepatic NK cells and relative mechanism in hepatocellular carcinoma patients. *Clinical Immunology* 129, 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.08.012>
- Calo, N., Ramadori, P., Sobolewski, C., Romero, Y., Maeder, C., Fournier, M., Rantakari, P., Zhang, F.-P., Poutanen, M., Dufour, J.-F., Humar, B., Nef, S., Foti, M., 2016. Stress-activated miR-21/miR-21* in hepatocytes promotes lipid and glucose metabolic disorders associated with high-fat diet consumption. *Gut* 65, 1871–1881. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310822>
- Camp, R.L., Scheynius, A., Johansson, C., Puré, E., 1993. CD44 is necessary for optimal contact allergic responses but is not required for normal leukocyte extravasation. *Journal of Experimental Medicine* 178, 497–507. <https://doi.org/10.1084/jem.178.2.497>
- Caon, I., Bartolini, B., Parnigoni, A., Caravà, E., Moretto, P., Viola, M., Karousou, E., Vigetti, D., Passi, A., 2020. Revisiting the hallmarks of cancer: The role of hyaluronan. *Seminars in Cancer Biology, Translating Extracellular Matrix* 62, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.007>
- Carambia, A., Freund, B., Schwinge, D., Heine, M., Laschtowitz, A., Huber, S., Wraith, D.C., Korn, T., Schramm, C., Lohse, A.W., Heeren, J., Herkel, J., 2014. TGF- β -dependent induction of CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *Journal of Hepatology* 61, 594–599. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.04.027>
- Carter, J.K., Friedman, S.L., 2022. Hepatic Stellate Cell-Immune Interactions in NASH. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13, 867940. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.867940>
- Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J.K.M., Doherty, J.M., Mills, J.C., Colonna, M., 2009. A human NK cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 457, 722–725. <https://doi.org/10.1038/nature07537>
- Cella, M., Otero, K., Colonna, M., 2010. Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1 β reveals intrinsic functional plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 10961–10966. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005641107>
- Cepero-Donates, Y., Lacraz, G., Ghobadi, F., Rakotoarivelo, V., Orkhis, S., Mayhue, M., Chen, Y.-G., Rola-Pleszczynski, M., Menendez, A., Ilangumaran, S., Ramanathan, S., 2016. Interleukin-15-mediated inflammation promotes non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine, Cytokines in inflammation, aging, cancer and obesity* 82, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.01.020>

- Chan, W.-K., Chuah, K.-H., Rajaram, R.B., Lim, L.-L., Ratnasingam, J., Vethakkan, S.R., 2023. Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD): A State-of-the-Art Review. *J Obes Metab Syndr* 32, 197–213. <https://doi.org/10.7570/jomes23052>
- Chea, S., Possot, C., Perchet, T., Petit, M., Cumano, A., Golub, R., 2015. CXCR6 Expression Is Important for Retention and Circulation of ILC Precursors. *Mediators Inflamm* 2015, 368427. <https://doi.org/10.1155/2015/368427>
- Chen, D., Luo, X., Xie, H., Gao, Z., Fang, H., Huang, J., 2013. Characteristics of IL-17 induction by *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mouse liver. *Immunology* 139, 523–532. <https://doi.org/10.1111/imm.12105>
- Chen, J., Ivashkiv, L.B., 2010. IFN- γ abrogates endotoxin tolerance by facilitating Toll-like receptor-induced chromatin remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 19438–19443. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007816107>
- Cheng, C., Tan, J., Qian, W., Zhang, L., Hou, X., 2018. Gut inflammation exacerbates hepatic injury in the high-fat diet induced NAFLD mouse: Attention to the gut-vascular barrier dysfunction. *Life Sci* 209, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.017>
- Cheng, C., Zhang, Q., Li, Y., Jiang, J., Xie, L., Shen, H., Wu, D., Zhang, Hejiao, Zhang, Huiru, Wang, X., Wu, H., Xu, J., Gui, L., Li, B., Ju, C., Peng, H., Yin, S., Xu, L., 2022. Interplay Between Liver Type 1 Innate Lymphoid Cells and NK Cells Drives the Development of Alcoholic Steatohepatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 15, 261–274. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.09.010>
- Cheng, M., Li, J., Jiayi, S., Song, H., Chen, Y., Tang, H., Wei, H., Sun, R., Tian, Z., Wang, X., Peng, H., 2024. ROR α is required for expansion and memory maintenance of ILC1s via a lymph node-liver axis. *Cell Reports* 43, 113786. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.113786>
- Cheung, O., Puri, P., Eicken, C., Contos, M.J., Mirshahi, F., Maher, J.W., Kellum, J.M., Min, H., Luketic, V.A., Sanyal, A.J., 2008. NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS IS ASSOCIATED WITH ALTERED HEPATIC MICRO RNA EXPRESSION. *Hepatology* 48, 1810–1820. <https://doi.org/10.1002/hep.22569>
- Chiossone, L., Dumas, P.-Y., Vienne, M., Vivier, E., 2018. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol* 18, 671–688. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0061-z>
- Cirillo, N., 2023. The Hyaluronan/CD44 Axis: A Double-Edged Sword in Cancer. *Int J Mol Sci* 24, 15812. <https://doi.org/10.3390/ijms242115812>
- Cong, J., Wang, X., Zheng, X., Wang, D., Fu, B., Sun, R., Tian, Z., Wei, H., 2018. Dysfunction of Natural Killer Cells by FBP1-Induced Inhibition of Glycolysis during Lung Cancer Progression. *Cell Metabolism* 28, 243-255.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.021>
- Constantinides, M.G., Link, V.M., Tamoutounour, S., Wong, A.C., Perez-Chaparro, P.J., Han, S.-J., Chen, Y.E., Li, K., Farhat, S., Weckel, A., Krishnamurthy, S.R., Vujkovic-Cvijin, I., Linehan, J.L., Bouladoux, N., Merrill, E.D., Roy, S., Cua, D.J., Adams, E.J., Bhandoola, A., Scharschmidt, T.C., Aubé, J., Fischbach, M.A., Belkaid, Y., 2019. MAIT cells are imprinted by the microbiota in early life and promote tissue repair. *Science* 366, eaax6624. <https://doi.org/10.1126/science.aax6624>
- Constantinides, M.G., McDonald, B.D., Verhoef, P.A., Bendelac, A., 2014. A committed hemopoietic precursor to innate lymphoid cells. *Nature* 508, 397–401. <https://doi.org/10.1038/nature13047>
- Cook, W.S., Jain, S., Jia, Y., Cao, W.-Q., Yeldandi, A.V., Reddy, J.K., Rao, M.S., 2001. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α -Responsive Genes Induced in the Newborn but Not Prenatal Liver of Peroxisomal Fatty Acyl-CoA Oxidase Null Mice. *Experimental Cell Research* 268, 70–76. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5266>
- Coquet, J.M., Chakravarti, S., Kyparissoudis, K., McNab, F.W., Pitt, L.A., McKenzie, B.S., Berzins, S.P., Smyth, M.J., Godfrey, D.I., 2008. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4–NK1.1– NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11287–11292. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801631105>
- Corbett, A.J., Eckle, S.B.G., Birkinshaw, R.W., Liu, L., Patel, O., Mahony, J., Chen, Z., Reantragoon, R., Meehan, B., Cao, H., Williamson, N.A., Strugnell, R.A., Van Sinderen, D., Mak, J.Y.W., Fairlie, D.P.,

- Kjer-Nielsen, L., Rossjohn, J., McCluskey, J., 2014. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature* 509, 361–365. <https://doi.org/10.1038/nature13160>
- Corral, D., Charton, A., Krauss, M.Z., Blanquart, E., Levillain, F., Lefrançois, E., Sneiderger, T., Vahlas, Z., Girard, J.-P., Eberl, G., Poquet, Y., Guéry, J.-C., Argüello, R.J., Belkaid, Y., Mayer-Barber, K.D., Hepworth, M.R., Neyrolles, O., Hudrisier, D., 2022. ILC precursors differentiate into metabolically distinct ILC1-like cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cell Rep* 39, 110715. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110715>
- Crinier, A., Milpied, P., Escalière, B., Piperoglou, C., Galluso, J., Balsamo, A., Spinelli, L., Cervera-Marzal, I., Ebbo, M., Girard-Madoux, M., Jaeger, S., Bollon, E., Hamed, S., Hardwigsen, J., Ugolini, S., Vély, F., Narni-Mancinelli, E., Vivier, E., 2018. High-Dimensional Single-Cell Analysis Identifies Organ-Specific Signatures and Conserved NK Cell Subsets in Humans and Mice. *Immunity* 49, 971-986.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.009>
- Crispe, I.N., 2011. Liver Antigen-Presenting Cells. *J Hepatol* 54, 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.10.005>
- Croft, C.A., Thaller, A., Marie, S., Doisne, J.-M., Surace, L., Yang, R., Puel, A., Bustamante, J., Casanova, J.-L., Di Santo, J.P., 2022. Notch, RORC and IL-23 signals cooperate to promote multi-lineage human innate lymphoid cell differentiation. *Nat Commun* 13, 4344. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32089-3>
- Cucarull, B., Tutusaus, A., Rider, P., Hernández-Alsina, T., Cuño, C., García de Frutos, P., Colell, A., Marí, M., Morales, A., 2022. Hepatocellular Carcinoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Advances. *Cancers* 14, 621. <https://doi.org/10.3390/cancers14030621>
- Cuff, A.O., Sillito, F., Dertschnig, S., Hall, A., Luong, T.V., Chakraverty, R., Male, V., 2019. The Obese Liver Environment Mediates Conversion of NK Cells to a Less Cytotoxic ILC1-Like Phenotype. *Front Immunol* 10, 2180. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02180>
- Dambach, D.M., Watson, L.M., Gray, K.R., Durham, S.K., Laskin, D.L., 2002. Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Hepatology* 35, 1093–1103. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.33162>
- Dasgupta, D., Nakao, Y., Mauer, A.S., Thompson, J.M., Sehrawat, T.S., Liao, C.-Y., Krishnan, A., Lucien, F., Guo, Q., Liu, M., Xue, F., Fukushima, M., Katsumi, T., Bansal, A., Pandey, M.K., Maiers, J.L., DeGrado, T., Ibrahim, S.H., Revzin, A., Pavelko, K.D., Barry, M.A., Kaufman, R.J., Malhi, H., 2020. IRE1A Stimulates Hepatocyte-derived Extracellular Vesicles That Promote Inflammation in Mice With Steatohepatitis. *Gastroenterology* 159, 1487-1503.e17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.031>
- Daussy, C., Faure, F., Mayol, K., Viel, S., Gasteiger, G., Charrier, E., Bienvenu, J., Henry, T., Debieu, E., Hasan, U.A., Marvel, J., Yoh, K., Takahashi, S., Prinz, I., de Bernard, S., Buffat, L., Walzer, T., 2014. T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *J Exp Med* 211, 563–577. <https://doi.org/10.1084/jem.20131560>
- Deczkowska, A., David, E., Ramadori, P., Pfister, D., Safran, M., Li, B., Giladi, A., Jaitin, D.A., Barboi, O., Cohen, M., Yofe, I., Gur, C., Shlomi-Loubaton, S., Henri, S., Suhail, Y., Qiu, M., Kam, S., Hermon, H., Lahat, E., Ben Yakov, G., Cohen-Ezra, O., Davidov, Y., Likhter, M., Goitein, D., Roth, S., Weber, A., Malissen, B., Weiner, A., Ben-Ari, Z., Heikenwälder, M., Elinav, E., Amit, I., 2021. XCR1+ type 1 conventional dendritic cells drive liver pathology in non-alcoholic steatohepatitis. *Nat Med* 27, 1043–1054. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01344-3>
- DeGrendele, H.C., Estess, P., Siegelman, M.H., 1997. Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 278, 672–675. <https://doi.org/10.1126/science.278.5338.672>
- Deng, X., Terunuma, H., Nieda, M., 2021. Immunosurveillance of Cancer and Viral Infections with Regard to Alterations of Human NK Cells Originating from Lifestyle and Aging. *Biomedicines* 9, 557. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050557>
- Deppermann, C., Kratochvil, R.M., Peiseler, M., David, B.A., Zindel, J., Castanheira, F.V.E.S., van der Wal, F., Carestia, A., Jenne, C.N., Marth, J.D., Kubers, P., 2020. Macrophage galactose lectin is critical for

- Kupffer cells to clear aged platelets. *J Exp Med* 217, e20190723. <https://doi.org/10.1084/jem.20190723>
- Devarbhavi, H., Asrani, S.K., Arab, J.P., Nartey, Y.A., Pose, E., Kamath, P.S., 2023. Global burden of liver disease: 2023 update. *Journal of Hepatology* 79, 516–537. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.03.017>
- Devisscher, L., Scott, C.L., Lefere, S., Raevens, S., Bogaerts, E., Paridaens, A., Verhelst, X., Geerts, A., Guilliams, M., Van Vlierberghe, H., 2017. Non-alcoholic steatohepatitis induces transient changes within the liver macrophage pool. *Cellular Immunology* 322, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.10.006>
- Dhar, D., Antonucci, L., Nakagawa, H., Kim, J.Y., Glitzner, E., Caruso, S., Shalpour, S., Yang, L., Valasek, M.A., Lee, S., Minnich, K., Seki, E., Tuckermann, J., Sibilia, M., Zucman-Rossi, J., Karin, M., 2018. Liver Cancer Initiation Requires p53 Inhibition by CD44-Enhanced Growth Factor Signaling. *Cancer Cell* 33, 1061–1077.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.05.003>
- Di Censo, C., Marotel, M., Mattioli, I., Müller, L., Scarno, G., Pietropaolo, G., Peruzzi, G., Laffranchi, M., Mazej, J., Hasim, M.S., Asif, S., Russo, E., Tomaipitnca, L., Stabile, H., Lee, S., Vian, L., Gadina, M., Gismondi, A., Shih, H., Mikami, Y., Capuano, C., Bernardini, G., Bonelli, M., Sozzani, S., Diefenbach, A., Ardolino, M., Santoni, A., Sciumè, G., 2021. Granzyme A and CD160 expression delineates ILC1 with graded functions in the mouse liver. *Eur J Immunol* 51, 2568–2575. <https://doi.org/10.1002/eji.202149209>
- Di Luccia, B., Gilfillan, S., Cella, M., Colonna, M., Huang, S.C.-C., 2019. ILC3s integrate glycolysis and mitochondrial production of reactive oxygen species to fulfill activation demands. *J Exp Med* 216, 2231–2241. <https://doi.org/10.1084/jem.20180549>
- Diedrich, T., Kummer, S., Galante, A., Drolz, A., Schlicker, V., Lohse, A.W., Kluwe, J., Eberhard, J.M., Schulze zur Wiesch, J., 2020. Characterization of the immune cell landscape of patients with NAFLD. *PLoS One* 15, e0230307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230307>
- Diehl, L., Schurich, A., Grochtmann, R., Hegenbarth, S., Chen, L., Knolle, P.A., 2008. Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology* 47, 296–305. <https://doi.org/10.1002/hep.21965>
- Dituri, F., Mancarella, S., Cigliano, A., Chieti, A., Giannelli, G., 2019. TGF- β as Multifaceted Orchestrator in HCC Progression: Signaling, EMT, Immune Microenvironment, and Novel Therapeutic Perspectives. *Semin Liver Dis* 39, 53–69. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1676121>
- Dodard, G., Tata, A., Erick, T.K., Jaime, D., Shahjahan Miah, S.M., Quatrini, L., Escalière, B., Ugolini, S., Vivier, E., Brossay, L., 2020. Inflammation-Induced Lactate Leads to Rapid Loss of Hepatic Tissue-Resident NK Cells. *Cell Rep* 32, 107855. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107855>
- Dong, H., Czaja, M.J., 2011. REGULATION OF LIPID DROPLETS BY AUTOPHAGY. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 22, 234. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.02.003>
- Dong, J., Viswanathan, S., Adami, E., Singh, B.K., Chothani, S.P., Ng, B., Lim, W.W., Zhou, J., Tripathi, M., Ko, N.S.J., Shekeran, S.G., Tan, J., Lim, S.Y., Wang, M., Lio, P.M., Yen, P.M., Schafer, S., Cook, S.A., Widjaja, A.A., 2021. Hepatocyte-specific IL11 cis-signaling drives lipotoxicity and underlies the transition from NAFLD to NASH. *Nat Commun* 12, 66. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20303-z>
- Dong, Y., Poon, G.F.T., Arif, A.A., Lee-Sayer, S.S.M., Dosanjh, M., Johnson, P., 2018. The survival of fetal and bone marrow monocyte-derived alveolar macrophages is promoted by CD44 and its interaction with hyaluronan. *Mucosal Immunology* 11, 601–614. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.83>
- Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D., Parks, E.J., 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115, 1343–1351. <https://doi.org/10.1172/JCI200523621>
- Donnelly, R.P., Loftus, R.M., Keating, S.E., Liou, K.T., Biron, C.A., Gardiner, C.M., Finlay, D.K., 2014. mTORC1-dependent metabolic reprogramming is a prerequisite for NK cell effector function. *J Immunol* 193, 4477–4484. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401558>

- Ducimetière, L., Lucchiari, G., Litscher, G., Nater, M., Heeb, L., Nuñez, N.G., Wyss, L., Burri, D., Vermeer, M., Gschwend, J., Moor, A.E., Becher, B., van den Broek, M., Tugues, S., 2021. Conventional NK cells and tissue-resident ILC1s join forces to control liver metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e2026271118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2026271118>
- Dudek, M., Pfister, D., Donakonda, S., Filpe, P., Schneider, A., Laschinger, M., Hartmann, D., Hüser, N., Meiser, P., Bayerl, F., Inverso, D., Wigger, J., Sebode, M., Öllinger, R., Rad, R., Hegenbarth, S., Anton, M., Guillot, A., Bowman, A., Heide, D., Müller, F., Ramadori, P., Leone, V., Garcia-Caceres, C., Gruber, T., Seifert, G., Kabat, A.M., Mallm, J.-P., Reider, S., Effenberger, M., Roth, S., Billeter, A.T., Müller-Stich, B., Pearce, E.J., Koch-Nolte, F., Käser, R., Tilg, H., Thimme, R., Boettler, T., Tacke, F., Dufour, J.-F., Haller, D., Murray, P.J., Heeren, R., Zehn, D., Böttcher, J.P., Heikenwälder, M., Knolle, P.A., 2021. Auto-aggressive CXCR6+ CD8 T cells cause liver immune pathology in NASH. *Nature* 592, 444–449. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03233-8>
- Dulai, P.S., Singh, S., Patel, J., Soni, M., Prokop, L.J., Younossi, Z., Sebastiani, G., Ekstedt, M., Hagstrom, H., Nasr, P., Stal, P., Wong, V.W.-S., Kechagias, S., Hultcrantz, R., Loomba, R., 2017. Increased risk of mortality by fibrosis stage in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Hepatology* 65, 1557–1565. <https://doi.org/10.1002/hep.29085>
- Eisterer, W., Bechter, O., Hilbe, W., van Driel, M., Lokhorst, H.M., Thaler, J., Bloem, A.C., Günthert, U., Stauder, R., 2001. CD44 isoforms are differentially regulated in plasma cell dyscrasias and CD44v9 represents a new independent prognostic parameter in multiple myeloma. *Leukemia Research* 25, 1051–1057. [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(01\)00075-3](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(01)00075-3)
- Ejima, C., Kuroda, H., Ishizaki, S., 2016. A novel diet-induced murine model of steatohepatitis with fibrosis for screening and evaluation of drug candidates for nonalcoholic steatohepatitis. *Physiol Rep* 4, e13016. <https://doi.org/10.14814/phy2.13016>
- Ertunc, M.E., Hotamisligil, G.S., 2016. Lipid signaling and lipotoxicity in metaflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. *J Lipid Res* 57, 2099–2114. <https://doi.org/10.1194/jlr.R066514>
- Fachi, J.L., Pral, L.P., Santos, J.A.C. dos, Codo, A.C., Oliveira, S. de, Felipe, J.S., Zambom, F.F.F., Câmara, N.O.S., Vieira, P.M.M.M., Colonna, M., Vinolo, M. a. R., 2021. Hypoxia enhances ILC3 responses through HIF-1 α -dependent mechanism. *Mucosal Immunology* 14, 828. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00371-6>
- Fan, Y., Zhang, W., Wei, H., Sun, R., Tian, Z., Chen, Y., 2020. Hepatic NK cells attenuate fibrosis progression of non-alcoholic steatohepatitis in dependent of CXCL10-mediated recruitment. *Liver International* 40, 598–608. <https://doi.org/10.1111/liv.14307>
- Fang, Z.-Q., Ruan, B., Liu, J.-J., Duan, J.-L., Yue, Z.-S., Song, P., Xu, H., Ding, J., Xu, C., Dou, G.-R., Wang, L., 2022. Notch-triggered maladaptation of liver sinusoidal endothelium aggravates nonalcoholic steatohepatitis through endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* 76, 742. <https://doi.org/10.1002/hep.32332>
- Farhadi, A., Gundlapalli, S., Shaikh, M., Frantzides, C., Harrell, L., Kwasny, M.M., Keshavarzian, A., 2008. Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 28, 1026–1033. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01723.x>
- Favaro, R.R., Phillips, K., Delaunay-Danguy, R., Ujčić, K., Markert, U.R., 2022. Emerging Concepts in Innate Lymphoid Cells, Memory, and Reproduction. *Front Immunol* 13, 824263. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.824263>
- Fehniger, T.A., Cai, S.F., Cao, X., Bredemeyer, A.J., Presti, R.M., French, A.R., Ley, T.J., 2007. Acquisition of Murine NK Cell Cytotoxicity Requires the Translation of a Pre-existing Pool of Granzyme B and Perforin mRNAs. *Immunity* 26, 798–811. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.04.010>
- Fischer, U., Jänicke, R.U., Schulze-Osthoff, K., 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10, 76–100. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401160>
- Friedrich, C., Taggenbrock, R.L.R.E., Doucet-Ladevèze, R., Golda, G., Moenius, R., Arampatzi, P., Kragten, N.A.M., Kreymborg, K., de Agüero, M.G., Kastenmueller, W., Saliba, A.-E., Grün, D., van Gisbergen, K.P.J.M., Gasteiger, G., 2021. Effector differentiation downstream of lineage

- commitment in ILC1 is driven by Hobit across tissues. *Nat Immunol* 22, 1256–1267. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01013-0>
- Fu, Q., Wei, Z., Xiao, P., Chen, Y., Liu, X., 2017. CD44 améliore la phagocytose des macrophages et joue un rôle protecteur dans l'infection à *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*. *Veterinary Microbiology* 198, 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.030>
- Fuchs, A., 2016. ILC1s in Tissue Inflammation and Infection. *Front Immunol* 7, 104. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00104>
- Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., Colonna, M., 2013. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN- γ -producing cells. *Immunity* 38, 769–781. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.010>
- Fuchs, C.D., Claudel, T., Trauner, M., 2014. Role of metabolic lipases and lipolytic metabolites in the pathogenesis of NAFLD. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 25, 576–585. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.08.001>
- Furuta, K., Guo, Q., Pavelko, K.D., Lee, J.-H., Robertson, K.D., Nakao, Y., Melek, J., Shah, V.H., Hirsova, P., Ibrahim, S.H., n.d. Lipid-induced endothelial vascular cell adhesion molecule 1 promotes nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *J Clin Invest* 131, e143690. <https://doi.org/10.1172/JCI143690>
- Gao, B., Ahmad, M.F., Nagy, L.E., Tsukamoto, H., 2019. Inflammatory Pathways in Alcoholic Steatohepatitis. *J Hepatol* 70, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.023>
- Gao, B., Jeong, W.-I., Tian, Z., 2008. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 47, 729–736. <https://doi.org/10.1002/hep.22034>
- Gao, Y., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Bald, T., Ng, S.S., Young, A., Ngiow, S.F., Rautela, J., Straube, J., Waddell, N., Blake, S.J., Yan, J., Bartholin, L., Lee, J.S., Vivier, E., Takeda, K., Messaoudene, M., Zitvogel, L., Teng, M.W.L., Belz, G.T., Engwerda, C.R., Huntington, N.D., Nakamura, K., Hölzel, M., Smyth, M.J., 2017. Tumor immunoevasion by the conversion of effector NK cells into type 1 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 18, 1004–1015. <https://doi.org/10.1038/ni.3800>
- Garcia-Martinez, I., Santoro, N., Chen, Y., Hoque, R., Ouyang, X., Caprio, S., Shlomchik, M.J., Coffman, R.L., Candia, A., Mehal, W.Z., n.d. Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9. *J Clin Invest* 126, 859–864. <https://doi.org/10.1172/JCI83885>
- Garner, L.C., Klenerman, P., Provine, N.M., 2018. Insights Into Mucosal-Associated Invariant T Cell Biology From Studies of Invariant Natural Killer T Cells. *Front Immunol* 9, 1478. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01478>
- Gautheron, J., Gores, G.J., Rodrigues, C.M.P., 2020. Lytic Cell Death in Metabolic Liver Disease. *J Hepatol* 73, 394–408. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.001>
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., Trinchieri, G., 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195, 327–333. <https://doi.org/10.1084/jem.20010938>
- Ghazarian, M., Revelo, X.S., Nøhr, M.K., Luck, H., Zeng, K., Lei, H., Tsai, S., Schroer, S.A., Park, Y.J., Chng, M.H.Y., Shen, L., D'Angelo, J.A., Horton, P., Chapman, W.C., Brockmeier, D., Woo, M., Engleman, E.G., Adeyi, O., Hirano, N., Jin, T., Gehring, A.J., Winer, S., Winer, D.A., 2017. Type I Interferon Responses Drive Intrahepatic T cells to Promote Metabolic Syndrome. *Sci Immunol* 2, eaai7616. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aai7616>
- Giraldez, M.D., Carneros, D., Garbers, C., Rose-John, S., Bustos, M., 2021. New insights into IL-6 family cytokines in metabolism, hepatology and gastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18, 787–803. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00473-x>
- Gladiator, A., Wangler, N., Trautwein-Weidner, K., LeibundGut-Landmann, S., 2013. Cutting Edge: IL-17–Secreting Innate Lymphoid Cells Are Essential for Host Defense against Fungal Infection. *The Journal of Immunology* 190, 521–525. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202924>
- Go, S.-I., Ko, G.H., Lee, W.S., Kim, R.B., Lee, J.-H., Jeong, S.-H., Lee, Y.-J., Hong, S.C., Ha, W.S., 2016. CD44 Variant 9 Serves as a Poor Prognostic Marker in Early Gastric Cancer, But Not in Advanced Gastric Cancer. *Cancer Res Treat* 48, 142–152. <https://doi.org/10.4143/crt.2014.227>

- Gomez, K.E., Wu, F., Keysar, S.B., Morton, J.J., Miller, B., Chimed, T.-S., Le, P.N., Nieto, C., Chowdhury, F.N., Tyagi, A., Lyons, T.R., Young, C.D., Zhou, H., Somerset, H.L., Wang, X.-J., Jimeno, A., 2020. Cancer cell CD44 mediates macrophage/monocyte-driven regulation of head and neck cancer stem cells. *Cancer Res* 80, 4185–4198. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1079>
- Gong, J., Tu, W., Liu, J., Tian, D., 2023. Hepatocytes: A key role in liver inflammation. *Front Immunol* 13, 1083780. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1083780>
- Gras Navarro, A., Björklund, A.T., Chekenya, M., 2015. Therapeutic Potential and Challenges of Natural Killer Cells in Treatment of Solid Tumors. *Front Immunol* 6, 202. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00202>
- Groom, J.R., Luster, A.D., 2011. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol* 89, 10.1038/icb.2010.158. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.158>
- Groschwitz, K.R., Hogan, S.P., 2009. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 124, 3–20; quiz 21–22. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
- Guan, H., Nagarkatti, P.S., Nagarkatti, M., 2009. Role of CD44 in the Differentiation of Th1 and Th2 Cells: CD44-Deficiency Enhances the Development of Th2 Effectors in Response to Sheep RBC and Chicken Ovalbumin1. *The Journal of Immunology* 183, 172–180. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802325>
- Guillot, A., Tacke, F., 2019. Liver Macrophages: Old Dogmas and New Insights. *Hepatol Commun* 3, 730–743. <https://doi.org/10.1002/hep4.1356>
- Gur, C., Doron, S., Kfir-Erenfeld, S., Horwitz, E., Abu-tair, L., Safadi, R., Mandelboim, O., 2012. NKp46-mediated killing of human and mouse hepatic stellate cells attenuates liver fibrosis. *Gut* 61, 885–893. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301400>
- Gurram, R.K., Wei, D., Yu, Q., Butcher, M.J., Chen, X., Cui, K., Hu, G., Zheng, M., Zhu, X., Oh, J., Sun, B., Joseph F. Urban, J., Zhao, K., Leonard, W.J., Zhu, J., 2023. Crosstalk between ILC2s and Th2 cells varies among mouse models. *Cell reports* 42, 112073. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112073>
- Haas, J.T., Vonghia, L., Mogilenko, D.A., Verrijken, A., Molendi-Coste, O., Fleury, S., Deprince, A., Nikitin, A., Woitrain, E., Ducrocq-Geoffroy, L., Pic, S., Derudas, B., Dehondt, H., Gheeraert, C., Van Gaal, L., Driessen, A., Lefebvre, P., Staels, B., Francque, S., Dombrowicz, D., 2019. Transcriptional Network Analysis Implicates Altered Hepatic Immune Function in NASH development and resolution. *Nat Metab* 1, 604–614. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0076-1>
- Hajer, G.R., van Haeften, T.W., Visseren, F.L.J., 2008. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal* 29, 2959–2971. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn387>
- Hamaguchi, M., Okamura, T., Fukuda, T., Nishida, K., Yoshimura, Y., Hashimoto, Y., Ushigome, E., Nakanishi, N., Majima, S., Asano, M., Yamazaki, M., Takakuwa, H., Kita, M., Fukui, M., 2021. Group 3 Innate Lymphoid Cells Protect Steatohepatitis From High-Fat Diet Induced Toxicity. *Front Immunol* 12, 648754. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.648754>
- Hammoutene, A., Rautou, P.-E., 2019. Role of liver sinusoidal endothelial cells in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* 70, 1278–1291. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.02.012>
- Hamoud, A., Weaver, L., Stec, D.E., Hinds, T.D., 2018. Bilirubin in the Liver to Gut Signaling Axis. *Trends Endocrinol Metab* 29, 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.01.002>
- Han, H., Ge, X., Komakula, S.S.B., Desert, R., Das, S., Song, Z., Chen, W., Athavale, D., Gaskell, H., Lantvit, D., Guzman, G., Nieto, N., 2023. Macrophage-derived Osteopontin (*SPP1*) Protects From Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 165, 201–217. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.03.228>
- Harly, C., Cam, M., Kaye, J., Bhandoola, A., 2018. Development and differentiation of early innate lymphoid progenitors. *J Exp Med* 215, 249–262. <https://doi.org/10.1084/jem.20170832>
- Harrison Stephen A., Bedossa Pierre, Guy Cynthia D., Schattenberg Jörn M., Loomba Rohit, Taub Rebecca, Labriola Dominic, Moussa Sam E., Neff Guy W., Rinella Mary E., Anstee Quentin M.,

- Abdelmalek Manal F., Younossi Zobair, Baum Seth J., Francque Sven, Charlton Michael R., Newsome Philip N., Lanthier Nicolas, Schiefke Ingolf, Mangia Alessandra, Pericàs Juan M., Patil Rashmee, Sanyal Arun J., Noureddin Mazen, Bansal Meena B., Alkhouri Naim, Castera Laurent, Rudraraju Madhavi, Ratziu Vlad, 2024. A Phase 3, Randomized, Controlled Trial of Resmetirom in NASH with Liver Fibrosis. *New England Journal of Medicine* 390, 497–509. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2309000>
- Hauptschein, R.S., Sloan, K.E., Torella, C., Moezzifard, R., Giel-Moloney, M., Zehetmeier, C., Unger, C., Ilag, L.L., Jay, D.G., 2005. Functional Proteomic Screen Identifies a Modulating Role for CD44 in Death Receptor–Mediated Apoptosis. *Cancer Research* 65, 1887–1896. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3571>
- He, Y., Rodrigues, R.M., Wang, X., Seo, W., Ma, J., Hwang, S., Fu, Y., Trojnar, E., Mátyás, C., Zhao, S., Ren, R., Feng, D., Pacher, P., Kunos, G., Gao, B., n.d. Neutrophil-to-hepatocyte communication via LDLR-dependent miR-223–enriched extracellular vesicle transfer ameliorates nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 131, e141513. <https://doi.org/10.1172/JCI141513>
- Hebbard, L., George, J., 2011. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8, 35–44. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.191>
- Hegde, P., Weiss, E., Paradis, V., Wan, J., Mabire, M., Sukriti, S., Rautou, P.-E., Albuquerque, M., Picq, O., Gupta, A.C., Ferrere, G., Gilgenkrantz, H., Kiaf, B., Toubal, A., Beaudoin, L., Lettéron, P., Moreau, R., Lehuen, A., Lotersztajn, S., 2018. Mucosal-associated invariant T cells are a profibrogenic immune cell population in the liver. *Nat Commun* 9, 2146. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04450-y>
- Hegde, V.L., Singh, N.P., Nagarkatti, P.S., Nagarkatti, M., 2008. CD44 mobilization in allogeneic dendritic cell–T cell immunological synapse plays a key role in T cell activation. *Journal of Leukocyte Biology* 84, 134–142. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107752>
- Heier, E.-C., Meier, A., Julich-Haertel, H., Djudjaj, S., Rau, M., Tschernig, T., Geier, A., Boor, P., Lammert, F., Lukacs-Kornek, V., 2017. Murine CD103+ dendritic cells protect against steatosis progression towards steatohepatitis. *Journal of Hepatology* 66, 1241–1250. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.01.008>
- Heinrich, B., Gertz, E.M., Schäffer, A.A., Craig, A.J., Ruf, B., Subramanyam, V., McVey, J.C., Diggs, L.P., Heinrich, S., Rosato, U., Ma, C., Yan, C., Hu, Y., Zhao, Y., Shen, T.-W., Kapoor, V., Telford, W., Kleiner, D., Stovroff, M.K., Dhani, H.S., Kang, J., Fishbein, T.M., Wang, X.W., Ruppin, E., Kroemer, A., Greten, T.F., Korangy, F., 2022. The Tumor Microenvironment Shapes Innate Lymphoid Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Gut* 71, 1161–1175. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-325288>
- Hendriks, T., Porsch, F., Kiss, M.G., Rajcic, D., Papac-Miličević, N., Hoebinger, C., Goederle, L., Hladik, A., Shaw, L.E., Horstmann, H., Knapp, S., Derdak, S., Bilban, M., Heintz, L., Krawczyk, M., Paternostro, R., Trauner, M., Farlik, M., Wolf, D., Binder, C.J., 2022. Soluble TREM2 levels reflect the recruitment and expansion of TREM2 macrophages that localize to fibrotic areas and limit NASH+. *Journal of Hepatology* 77, 1373–1385. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.06.004>
- Hepworth, M.R., Fung, T.C., Masur, S.H., Kelsen, J.R., McConnell, F.M., Dubrot, J., Withers, D.R., Hugues, S., Farrar, M.A., Reith, W., Eberl, G., Baldassano, R.N., Laufer, T.M., Elson, C.O., Sonnenberg, G.F., 2015. Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4+ T cells. *Science* 348, 1031–1035. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4812>
- Her, Z., Tan, J.H.L., Lim, Y.-S., Tan, S.Y., Chan, X.Y., Tan, W.W.S., Liu, M., Yong, K.S.M., Lai, F., Ceccarello, E., Zheng, Z., Fan, Y., Chang, K.T.E., Sun, L., Chang, S.C., Chin, C.-L., Lee, G.H., Dan, Y.Y., Chan, Y.-S., Lim, S.G., Chan, J.K.Y., Chandy, K.G., Chen, Q., 2020. CD4+ T Cells Mediate the Development of Liver Fibrosis in High Fat Diet-Induced NAFLD in Humanized Mice. *Front Immunol* 11, 580968. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.580968>
- Hernández-Alvarez, M.I., Sebastián, D., Vives, S., Ivanova, S., Bartoccioni, P., Kakimoto, P., Plana, N., Veiga, S.R., Hernández, V., Vasconcelos, N., Peddinti, G., Adrover, A., Jové, M., Pamplona, R., Gordaliza-Alaguero, I., Calvo, E., Cabré, N., Castro, R., Kuzmanic, A., Boutant, M., Sala, D., Hyotylainen, T., Orešič, M., Fort, J., Errasti-Murugarren, E., Rodrigues, C.M.P., Orozco, M., Joven,

- J., Cantó, C., Palacin, M., Fernández-Veledo, S., Vendrell, J., Zorzano, A., 2019. Deficient Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Phosphatidylserine Transfer Causes Liver Disease. *Cell* 177, 881-895.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.010>
- Herrera, B., Addante, A., Sánchez, A., 2017. BMP Signalling at the Crossroad of Liver Fibrosis and Regeneration. *Int J Mol Sci* 19, 39. <https://doi.org/10.3390/ijms19010039>
- Hewison, M., Adams, J.S., 2024. Regulation of extra-renal synthesis of 1,25(OH)₂D, in: Hewison, M., Bouillon, R., Giovannucci, E., Goltzman, D., Meyer, M., Welsh, J. (Eds.), *Feldman and Pike's Vitamin D (Fifth Edition)*. Academic Press, pp. 155–187. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91386-7.00023-4>
- Heyens, L.J.M., Busschots, D., Koek, G.H., Robaey, G., Francque, S., 2021. Liver Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: From Liver Biopsy to Non-invasive Biomarkers in Diagnosis and Treatment. *Frontiers in Medicine* 8.
- Heymann, F., Peusquens, J., Ludwig-Portugall, I., Kohlhepp, M., Ergen, C., Niemietz, P., Martin, C., van Rooijen, N., Ochando, J.C., Randolph, G.J., Luedde, T., Ginhoux, F., Kurts, C., Trautwein, C., Tacke, F., 2015. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology* 62, 279–291. <https://doi.org/10.1002/hep.27793>
- Heymann, F., Tacke, F., 2016. Immunology in the liver — from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13, 88–110. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.200>
- Hinks, T.S.C., Marchi, E., Jabeen, M., Olshansky, M., Kurioka, A., Pediongco, T.J., Meehan, B.S., Kostenko, L., Turner, S.J., Corbett, A.J., Chen, Z., Klenerman, P., McCluskey, J., 2019. Activation and In Vivo Evolution of the MAIT Cell Transcriptome in Mice and Humans Reveals Tissue Repair Functionality. *Cell Rep* 28, 3249-3262.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.039>
- Hirsova, P., Ibrabim, S.H., Gores, G.J., Malhi, H., 2016. Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis. *J Lipid Res* 57, 1758–1770. <https://doi.org/10.1194/jlr.R066357>
- Hoechst, B., Voigtlaender, T., Ormandy, L., Gamrekashvili, J., Zhao, F., Wedemeyer, H., Lehner, F., Manns, M.P., Greten, T.F., Korangy, F., 2009. Myeloid Derived Suppressor Cells Inhibit Natural Killer Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma via the NKp30 Receptor. *Hepatology* 50, 799–807. <https://doi.org/10.1002/hep.23054>
- Hotta, Y., Nakamura, H., Konishi, M., Murata, Y., Takagi, H., Matsumura, S., Inoue, K., Fushiki, T., Itoh, N., 2009. Fibroblast Growth Factor 21 Regulates Lipolysis in White Adipose Tissue But Is Not Required for Ketogenesis and Triglyceride Clearance in Liver. *Endocrinology* 150, 4625–4633. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0119>
- Hou, J., Zhang, J., Cui, P., Zhou, Y., Liu, C., Wu, X., Ji, Y., Wang, S., Cheng, B., Ye, H., Shu, L., Zhang, K., Wang, D., Xu, J., Shu, Q., Colonna, M., Fang, X., n.d. TREM2 sustains macrophage-hepatocyte metabolic coordination in nonalcoholic fatty liver disease and sepsis. *J Clin Invest* 131, e135197. <https://doi.org/10.1172/JCI135197>
- Hou, X., Yin, S., Ren, R., Liu, S., Yong, L., Liu, Y., Li, Y., Zheng, M.-H., Kunos, G., Gao, B., Wang, H., 2021. Myeloid cell-specific IL-6 signaling promotes miR-223-enriched exosome production to attenuate NAFLD-associated fibrosis. *Hepatology* 74, 116–132. <https://doi.org/10.1002/hep.31658>
- Hsu, W., Shu, S.-A., Gershwin, E., Lian, Z.-X., 2007. The current immune function of hepatic dendritic cells. *Cell Mol Immunol* 4, 321–328.
- Huang, L., Zheng, J., Sun, G., Yang, H., Sun, X., Yao, X., Lin, A., Liu, H., 2022. 5-Aminosalicylic acid ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by modulating gut microbiota and bile acid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 79, 460. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04471-3>
- Huang, S., Martin, E., Kim, S., Yu, L., Soudais, C., Fremont, D.H., Lantz, O., Hansen, T.H., 2009. MR1 antigen presentation to mucosal-associated invariant T cells was highly conserved in evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8290–8295. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903196106>
- Huang, S., Wu, J., Gao, X., Zou, S., Chen, L., Yang, Xilang, Sun, C., Du, Y., Zhu, B., Li, J., Yang, Xuecheng, Feng, X., Wu, C., Shi, C., Wang, B., Lu, Y., Liu, J., Zheng, X., Gong, F., Lu, M., Yang, D., 2018. LSECs express functional NOD1 receptors: A role for NOD1 in LSEC maturation-induced T cell

- immunity in vitro. *Molecular Immunology* 101, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.06.002>
- Huang, Y., Guo, L., Qiu, J., Chen, X., Hu-Li, J., Siebenlist, U., Williamson, P.R., Urban, J.F., Paul, W.E., 2015. IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1hi cells are multipotential “inflammatory” type 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 16, 161–169. <https://doi.org/10.1038/ni.3078>
- Huang, Y., Mao, K., Germain, R.N., 2018. Thinking differently about ILCs—Not just tissue resident and not just the same as CD4+ T-cell effectors. *Immunol Rev* 286, 160–171. <https://doi.org/10.1111/imr.12704>
- Hwang, S., He, Y., Xiang, X., Seo, W., Kim, S.-J., Ma, J., Ren, T., Park, S.H., Zhou, Z., Feng, D., Kunos, G., Gao, B., 2020a. Interleukin-22 ameliorates neutrophil-driven nonalcoholic steatohepatitis through multiple targets. *Hepatology* 72, 412–429. <https://doi.org/10.1002/hep.31031>
- Hwang, S., Wang, X., Rodrigues, R.M., Ma, J., He, Y., Seo, W., Park, S.H., Kim, S.-J., Feng, D., Gao, B., 2020b. Protective and Detrimental Roles of p38 α MAPK in Different Stages of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* 72, 873–891. <https://doi.org/10.1002/hep.31390>
- Ibrahim, J., Nguyen, A.H., Rehman, A., Ochi, A., Jamal, M., Graffeo, C.S., Henning, J.R., Zambirinis, C.P., Fallon, N., Barilla, R., Badar, S., Mitchell, A., Rao, R., Acehan, D., Frey, A.B., Miller, G., 2012. Dendritic Cell Populations with Different Concentrations of Lipid Regulate Tolerance and Immunity in Mouse and Human Liver. *Gastroenterology* 143, 1061–1072. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.003>
- Ibrahim, S.H., Hirsova, P., Gores, G.J., 2018. Non-alcoholic steatohepatitis pathogenesis: sublethal hepatocyte injury as a driver of liver inflammation. *Gut* 67, 963–972. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315691>
- Ibrahim, S.H., Hirsova, P., Malhi, H., Gores, G.J., 2016a. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Dig Dis Sci* 61, 1325–1336. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3977-1>
- Ibrahim, S.H., Hirsova, P., Tomita, K., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Harrison, S.A., Goodfellow, V.S., Malhi, H., Gores, G.J., 2016b. Mixed Lineage Kinase 3 Mediates Release of C-X-C Motif Ligand 10-Bearing Chemotactic Extracellular Vesicles from Lipotoxic Hepatocytes. *Hepatology* 63, 731–744. <https://doi.org/10.1002/hep.28252>
- Jacobs, A., Warda, A.-S., Verbeek, J., Cassiman, D., Spincemaille, P., 2016. An Overview of Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Past to Present. *Current Protocols in Mouse Biology* 6, 185–200. <https://doi.org/10.1002/cpmo.3>
- Jacquelot, N., Seillet, C., Vivier, E., Belz, G.T., 2022. Innate lymphoid cells and cancer. *Nat Immunol* 23, 371–379. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01127-z>
- Jarick, K.J., Topczewska, P.M., Jakob, M.O., Yano, H., Arifuzzaman, M., Gao, X., Boulekou, S., Stokic-Trtica, V., Leclere, P., Preusser, A., Rompe, Z.A., Stamm, A., Tsou, A.M., Chu, C., Heinrich, F.R., Guerra, G.M., Durek, P., Ivanov, A., Beule, D., Helfrich, S., Duerr, C.U., Kühl, A.A., Stehle, C., Romagnani, C., Mashreghi, M.-F., Diefenbach, A., Artis, D., Klose, C.S.N., 2022. Non-redundant functions of group 2 innate lymphoid cells. *Nature* 611, 794–800. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05395-5>
- Jensen-Cody, S.O., Potthoff, M.J., 2020. Hepatokines and metabolism: Deciphering communication from the liver. *Mol Metab* 44, 101138. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101138>
- Jeong, W.-I., Park, O., Radaeva, S., Gao, B., 2006. STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology* 44, 1441–1451. <https://doi.org/10.1002/hep.21419>
- Ji, Y., Luo, Z., Gao, H., Dos Reis, F.C.G., Bandyopadhyay, G., Jin, Z., Manda, K.A., Isaac, R., Yang, M., Fu, W., Ying, W., Olefsky, J.M., 2021. Hepatocyte-derived exosomes from early onset obese mice promote insulin sensitivity through miR-3075. *Nat Metab* 3, 1163–1174. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00444-1>
- Jia, W., Wei, M., Rajani, C., Zheng, X., 2021. Targeting the alternative bile acid synthetic pathway for metabolic diseases. *Protein Cell* 12, 411–425. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00804-9>

- Jiang, X., Zhang, F., Ji, X., Dong, F., Yu, H., Xue, M., Qiu, Y., Yang, F., Hu, X., Bao, Z., 2021. Lipid-injured hepatocytes release sOPN to improve macrophage migration via CD44 engagement and pFak-NFκB signaling. *Cytokine* 142, 155474. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155474>
- Jin, K., Liu, Y., Shi, Y., Zhang, H., Sun, Y., Zhangyuan, G., Wang, F., Yu, W., Wang, J., Tao, X., Chen, X., Zhang, W., Sun, B., 2020. PTPROt aggravates inflammation by enhancing NF-κB activation in liver macrophages during nonalcoholic steatohepatitis. *Theranostics* 10, 5290–5304. <https://doi.org/10.7150/thno.42658>
- Jones, R.G., Elford, A.R., Parsons, M.J., Wu, L., Krawczyk, C.M., Yeh, W.-C., Hakem, R., Rottapel, R., Woodgett, J.R., Ohashi, P.S., 2002. CD28-dependent Activation of Protein Kinase B/Akt Blocks Fas-mediated Apoptosis by Preventing Death-inducing Signaling Complex Assembly. *Journal of Experimental Medicine* 196, 335–348. <https://doi.org/10.1084/jem.20020307>
- Jordan, A.R., Racine, R.R., 2015. The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00182>
- Joshi-Barve, S., Barve, S.S., Amancherla, K., Gobejishvili, L., Hill, D., Cave, M., Hote, P., McClain, C.J., 2007. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology* 46, 823–830. <https://doi.org/10.1002/hep.21752>
- Juza, R.M., Pauli, E.M., 2014. Clinical and surgical anatomy of the liver: A review for clinicians. *Clinical Anatomy* 27, 764–769. <https://doi.org/10.1002/ca.22350>
- Kahraman, A., Schlattjan, M., Kocabayoglu, P., Yildiz-Meziletoglu, S., Schlensak, M., Fingas, C.D., Wedemeyer, I., Marquitan, G., Gieseler, R.K., Baba, H.A., Gerken, G., Canbay, A., 2010. Major histocompatibility complex class I-related chains A and B (MIC A/B): a novel role in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 51, 92–102. <https://doi.org/10.1002/hep.23253>
- Kalra, A., Yetiskul, E., Wehrle, C.J., Tuma, F., 2024. Physiology, Liver, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Kamm, D.R., McCommis, K.S., 2022. Hepatic Stellate Cells in Physiology and Pathology. *J Physiol* 600, 1825–1837. <https://doi.org/10.1113/JP281061>
- Kanevskiy, L.M., Erokhina, S.A., Streltsova, M.A., Ziganshin, R.H., Telford, W.G., Sapozhnikov, A.M., Kovalenko, E.I., 2019. The Role of O-Antigen in LPS-Induced Activation of Human NK Cells. *J Immunol Res* 2019, 3062754. <https://doi.org/10.1155/2019/3062754>
- Kanevskiy, L.M., Telford, W.G., Sapozhnikov, A.M., Kovalenko, E.I., 2013. Lipopolysaccharide induces IFN-γ production in human NK cells. *Front Immunol* 4, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00011>
- Kang, H.S., Liao, G., DeGraff, L.M., Gerrish, K., Bortner, C.D., Garantziotis, S., Jetten, A.M., 2013. CD44 Plays a Critical Role in Regulating Diet-Induced Adipose Inflammation, Hepatic Steatosis, and Insulin Resistance. *PLoS One* 8, e58417. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058417>
- Kang, J., Liggett, J.R., Patil, D., Ranjit, S., Loh, K., Duttargi, A., Cui, Y., Oza, K., Frank, B.S., Kwon, D., Kallakury, B., Robson, S.C., Fishbein, T.M., Cui, W., Khan, K., Kroemer, A., 2022. Type 1 Innate Lymphoid Cells Are Proinflammatory Effector Cells in Ischemia-Reperfusion Injury of Steatotic Livers. *Front Immunol* 13, 899525. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.899525>
- Karim, G., Bansal, M.B., 2023. Resmetirum: An Orally Administered, Smallmolecule, Liver-directed, β-selective THR Agonist for the Treatment of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Non-alcoholic Steatohepatitis. *touchREV Endocrinol* 19, 60–70. <https://doi.org/10.17925/EE.2023.19.1.60>
- Karl, M., Hasselwander, S., Zhou, Y., Reifenberg, G., Kim, Y.O., Park, K.-S., Ridder, D.A., Wang, X., Seidel, E., Hövelmeyer, N., Straub, B.K., Li, H., Schuppan, D., Xia, N., 2022. Dual roles of B lymphocytes in mouse models of diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 76, 1135–1149. <https://doi.org/10.1002/hep.32428>
- Kasal, D.N., Bendelac, A., 2020. Multi-transcription factor reporter mice delineate early precursors to the ILC and LTi lineages. *J Exp Med* 218, e20200487. <https://doi.org/10.1084/jem.20200487>
- Kaser, S., Moschen, A., Cayon, A., Kaser, A., Crespo, J., Pons-Romero, F., Ebenbichler, C.F., Patsch, J.R., Tilg, H., 2005. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 54, 117–121. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.037010>

- Kashireddy, P.V., Rao, M.S., 2004. Lack of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice enhances methionine and choline deficient diet-induced steatohepatitis. *Hepatology* 39, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.hepres.2004.06.004>
- Kassiotis, G., Garcia, S., Simpson, E., Stockinger, B., 2002. Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nat Immunol* 3, 244–250. <https://doi.org/10.1038/ni766>
- Katayama, Y., Hidalgo, A., Chang, J., Peired, A., Frenette, P.S., 2005. CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *J Exp Med* 201, 1183–1189. <https://doi.org/10.1084/jem.20042014>
- Kawana, H., Karaki, H., Higashi, M., Miyazaki, M., Hilberg, F., Kitagawa, M., Harigaya, K., 2008. CD44 Suppresses TLR-Mediated Inflammation. *The Journal of Immunology* 180, 4235–4245. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.4235>
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H., Taniguchi, M., 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278, 1626–1629. <https://doi.org/10.1126/science.278.5343.1626>
- Kawano, Y., Cohen, D.E., 2013. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 48, 434–441. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0758-5>
- Keating, S.E., Zaiatz-Bittencourt, V., Loftus, R.M., Keane, C., Brennan, K., Finlay, D.K., Gardiner, C.M., 2016. Metabolic Reprogramming Supports IFN- γ Production by CD56bright NK Cells. *The Journal of Immunology* 196, 2552–2560. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501783>
- Keppel, M.P., Topcagic, N., Mah, A.Y., Vogel, T.P., Cooper, M.A., 2015. Activation-specific metabolic requirements for NK cell IFN- γ production. *J Immunol* 194, 1954–1962. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402099>
- Khameneh, H.J., Fonta, N., Zenobi, A., Niogret, C., Ventura, P., Guerra, C., Kwee, I., Rinaldi, A., Pecoraro, M., Geiger, R., Cavalli, A., Bertoni, F., Vivier, E., Trumpp, A., Guarda, G., 2023. Myc controls NK cell development, IL-15-driven expansion, and translational machinery. *Life Sci Alliance* 6, e202302069. <https://doi.org/10.26508/lsa.202302069>
- Khan, A.U.H., Ali, A.K., Marr, B., Jo, D., Ahmadvand, S., Fong-McMaster, C., Almutairi, S.M., Wang, L., Sad, S., Harper, M.-E., Lee, S.-H., 2023. The TNF α /TNFR2 axis mediates natural killer cell proliferation by promoting aerobic glycolysis. *Cell Mol Immunol* 20, 1140–1155. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01071-4>
- Kidani, Y., Elsaesser, H., Hock, M.B., Vergnes, L., Williams, K.J., Argus, J.P., Marbois, B.N., Komisopoulou, E., Wilson, E.B., Osborne, T.F., Graeber, T.G., Reue, K., Brooks, D.G., Bensinger, S.J., 2013. The sterol regulatory element binding proteins are essential for the metabolic programming of effector T cells and adaptive immunity. *Nat Immunol* 14, 489–499. <https://doi.org/10.1038/ni.2570>
- Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H., 1975. „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *European Journal of Immunology* 5, 112–117. <https://doi.org/10.1002/eji.1830050208>
- Kim, H.M., Lee, B.R., Lee, E.S., Kwon, M.H., Huh, J.H., Kwon, B.-E., Park, E.-K., Chang, S.-Y., Kweon, M.-N., Kim, P.-H., Ko, H.-J., Chung, C.H., 2018. iNKT cells prevent obesity-induced hepatic steatosis in mice in a C-C chemokine receptor 7-dependent manner. *Int J Obes (Lond)* 42, 270–279. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.200>
- Kindermann, M., Knipfer, L., Obermeyer, S., Müller, U., Alber, G., Bogdan, C., Schleicher, U., Neurath, M.F., Wirtz, S., 2020. Group 2 Innate Lymphoid Cells (ILC2) Suppress Beneficial Type 1 Immune Responses During Pulmonary Cryptococcosis. *Front Immunol* 11, 209. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00209>
- Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.-C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A.J., Sanyal, A.J., Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network, 2005. Design and validation of a histological scoring

- system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41, 1313–1321. <https://doi.org/10.1002/hep.20701>
- Klose, C.S.N., Flach, M., Möhle, L., Rogell, L., Hoyler, T., Ebert, K., Fabiunke, C., Pfeifer, D., Sexl, V., Fonseca-Pereira, D., Domingues, R.G., Veiga-Fernandes, H., Arnold, S.J., Busslinger, M., Dunay, I.R., Tanriver, Y., Diefenbach, A., 2014. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* 157, 340–356. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.030>
- Knorr, J., Wree, A., Tacke, F., Feldstein, A.E., 2020. The NLRP3 Inflammasome in Alcoholic and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 40, 298–306. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1708540>
- Kodama, K., Horikoshi, M., Toda, K., Yamada, S., Hara, K., Irie, J., Sirota, M., Morgan, A.A., Chen, R., Ohtsu, H., Maeda, S., Kadowaki, T., Butte, A.J., 2012. Expression-based genome-wide association study links the receptor CD44 in adipose tissue with type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 7049–7054. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114513109>
- Kodama, K., Toda, K., Morinaga, S., Yamada, S., Butte, A.J., 2015. Anti-CD44 Antibody Treatment Lowers Hyperglycemia and Improves Insulin Resistance, Adipose Inflammation, and Hepatic Steatosis in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* 64, 867–875. <https://doi.org/10.2337/db14-0149>
- 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., Woods, S.C., Seeley, R.J., 2010. High-Fructose Medium-Chain-Trans-Fat Diet Induces Liver Fibrosis & Elevates Plasma Coenzyme Q9 in a Novel Murine Model of Obesity and NASH. *Hepatology* 52, 934–944. <https://doi.org/10.1002/hep.23797>
- Kolliopoulos, C., Ali, M.M., Castillejo-Lopez, C., Heldin, C.-H., Heldin, P., 2022. CD44 Depletion in Glioblastoma Cells Suppresses Growth and Stemness and Induces Senescence. *Cancers* 14, 3747. <https://doi.org/10.3390/cancers14153747>
- Koop, A.C., Thiele, N.D., Steins, D., Michaëlsson, E., Wehmeyer, M., Scheja, L., Steglich, B., Huber, S., Schulze zur Wiesch, J., Lohse, A.W., Heeren, J., Kluwe, J., 2020. Therapeutic Targeting of Myeloperoxidase Attenuates NASH in Mice. *Hepatol Commun* 4, 1441–1458. <https://doi.org/10.1002/hep4.1566>
- Krämer, B., Nalin, A.P., Ma, F., Eickhoff, S., Lutz, P., Leonardelli, S., Goeser, F., Finnemann, C., Hack, G., Raabe, J., ToVinh, M., Ahmad, S., Hoffmeister, C., Kaiser, K.M., Manekeller, S., Branchi, V., Bald, T., Hölzel, M., Hüneburg, R., Nischalke, H.D., Semaan, A., Langhans, B., Kaczmarek, D.J., Benner, B., Lordo, M.R., Kowalski, J., Gerhardt, A., Timm, J., Toma, M., Mohr, R., Türler, A., Charpentier, A., van Bremen, T., Feldmann, G., Sattler, A., Kotsch, K., Abdallah, A.T., Strassburg, C.P., Spengler, U., Carson, W.E., Mundy-Bosse, B.L., Pellegrini, M., O’Sullivan, T.E., Freud, A.G., Nattermann, J., 2023. Single-cell RNA sequencing identifies a population of human liver-type ILC1s. *Cell Rep* 42, 111937. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111937>
- Krenkel, O., Puengel, T., Govaere, O., Abdallah, A.T., Mossanen, J.C., Kohlhepp, M., Liepelt, A., Lefebvre, E., Luedde, T., Hellerbrand, C., Weiskirchen, R., Longerich, T., Costa, I.G., Anstee, Q.M., Trautwein, C., Tacke, F., 2018. Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis. *Hepatology* 67, 1270. <https://doi.org/10.1002/hep.29544>
- Kubes, P., Jenne, C., 2018. Immune Responses in the Liver. *Annual Review of Immunology* 36, 247–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052415>
- Kurlawalla-Martinez, C., Stiles, B., Wang, Y., Devaskar, S.U., Kahn, B.B., Wu, H., 2005. Insulin Hypersensitivity and Resistance to Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice Lacking PTEN in Adipose Tissue. *Mol Cell Biol* 25, 2498–2510. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.6.2498-2510.2005>
- Lacotte, S., Slits, F., Moeckli, B., Peloso, A., Koenig, S., Tihy, M., El Hajji, S., Gex, Q., Rubbia-Brandt, L., Toso, C., n.d. Anti-CD122 antibody restores specific CD8+ T cell response in nonalcoholic steatohepatitis and prevents hepatocellular carcinoma growth. *Oncoimmunology* 12, 2184991. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2023.2184991>

- Lanthier, N., Molendi-Coste, O., Horsmans, Y., van Rooijen, N., Cani, P.D., Leclercq, I.A., 2010. Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298, G107-116. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00391.2009>
- Lauzon, N.M., Mian, F., MacKenzie, R., Ashkar, A.A., 2006. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell Immunol* 241, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2006.08.004>
- Lee, B.-C., Kim, M.-S., Pae, M., Yamamoto, Y., Eberlé, D., Shimada, T., Kamei, N., Park, H.-S., Sasorith, S., Woo, J.R., You, J., Mosher, W., Brady, H.J.M., Shoelson, S.E., Lee, J., 2016. Adipose natural killer cells regulate adipose tissue macrophages to promote insulin resistance in obesity. *Cell Metab* 23, 685–698. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.03.002>
- Lee, G.A., Liou, Y.-H., Wang, S.-W., Ko, K.-L., Jiang, S.-T., Liao, N.-S., 2011. Different NK Cell Developmental Events Require Different Levels of IL-15 Trans-Presentation. *The Journal of Immunology* 187, 1212–1221. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100331>
- Lefebvre, D.C., Lai, J.C.Y., Maeshima, N., Ford, J.L., Wong, A.S.L., Cross, J.L., Johnson, P., 2010. CD44 interacts directly with Lck in a zinc-dependent manner. *Molecular Immunology* 47, 1882–1889. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.03.018>
- Leitner, B.P., Huang, S., Brychta, R.J., Duckworth, C.J., Baskin, A.S., McGehee, S., Tal, I., Dieckmann, W., Gupta, G., Kolodny, G.M., Pacak, K., Herscovitch, P., Cypess, A.M., Chen, K.Y., 2017. Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 8649–8654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705287114>
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678–689. <https://doi.org/10.1038/nri2156>
- Li, C., Du, X., Shen, Z., Wei, Y., Wang, Y., Han, X., Jin, H., Zhang, C., Li, M., Zhang, Z., Wang, S., Zhang, D., Sun, G., 2022. The Critical and Diverse Roles of CD4–CD8– Double Negative T Cells in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 13, 1805–1827. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.02.019>
- Li, F., Hao, X., Chen, Y., Bai, L., Gao, X., Lian, Z., Wei, H., Sun, R., Tian, Z., 2017. The microbiota maintain homeostasis of liver-resident $\gamma\delta$ T-17 cells in a lipid antigen/CD1d-dependent manner. *Nat Commun* 8, 13839. <https://doi.org/10.1038/ncomms13839>
- Li, J., Chen, Q., Yi, J., Lan, X., Lu, K., Du, X., Guo, Z., Guo, Y., Geng, M., Li, D., Lu, S., 2021. IFN- γ contributes to the hepatic inflammation in HFD-induced nonalcoholic steatohepatitis by STAT1 β /TLR2 signaling pathway. *Molecular Immunology* 134, 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.03.005>
- Li, M., He, Y., Zhou, Z., Ramirez, T., Gao, Yueqiu, Gao, Yanhang, Ross, R.A., Cao, H., Cai, Y., Xu, M., Feng, D., Zhang, P., Liangpunsakul, S., Gao, B., 2017. MicroRNA-223 ameliorates alcoholic liver injury by inhibiting the IL-6–p47phox–oxidative stress pathway in neutrophils. *Gut* 66, 705–715. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311861>
- Li, R., Oteiza, A., Sørensen, K.K., McCourt, P., Olsen, R., Smedsrød, B., Svistounov, D., 2011. Role of liver sinusoidal endothelial cells and stabilins in elimination of oxidized low-density lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, G71–G81. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00215.2010>
- Li, T., Yang, Y., Hua, X., Wang, G., Liu, W., Jia, C., Tai, Y., Zhang, Q., Chen, G., 2012. Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and IDO. *Cancer Letters* 318, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.020>
- Li, X., Wang, Y., Wang, H., Huang, C., Huang, Y., Li, J., 2015. Endoplasmic reticulum stress is the crossroads of autophagy, inflammation, and apoptosis signaling pathways and participates in liver fibrosis. *Inflamm. Res.* 64, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00011-014-0772-y>
- Li, Y., Huang, B., Jiang, X., Chen, W., Zhang, J., Wei, Y., Chen, Y., Lian, M., Bian, Z., Miao, Q., Peng, Y., Fang, J., Wang, Q., Tang, R., Gershwin, M.E., Ma, X., 2018. Mucosal-Associated Invariant T Cells Improve Nonalcoholic Fatty Liver Disease Through Regulating Macrophage Polarization. *Front Immunol* 9, 1994. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01994>

- Li, Z.Z., Berk, M., McIntyre, T.M., Feldstein, A.E., 2009. Hepatic Lipid Partitioning and Liver Damage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Biol Chem* 284, 5637–5644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807616200>
- Liang, J., Jiang, D., Griffith, J., Yu, S., Fan, J., Zhao, X., Bucala, R., Noble, P.W., 2007. CD44 Is a Negative Regulator of Acute Pulmonary Inflammation and Lipopolysaccharide-TLR Signaling in Mouse Macrophages¹. *The Journal of Immunology* 178, 2469–2475. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2469>
- Liaskou, E., Zimmermann, H.W., Li, K.-K., Oo, Y.H., Suresh, S., Stamataki, Z., Qureshi, O., Lalor, P.F., Shaw, J., Syn, W., Curbishley, S.M., Adams, D.H., 2013. Monocyte Subsets in Human Liver Disease Show Distinct Phenotypic and Functional Characteristics. *Hepatology* 57, 385–398. <https://doi.org/10.1002/hep.26016>
- Lieber, C.S., Leo, M.A., Mak, K.M., Xu, Y., Cao, Q., Ren, C., Ponomarenko, A., DeCarli, L.M., 2004. Model of nonalcoholic steatohepatitis¹²³⁴. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79, 502–509. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.3.502>
- Lim, A.I., Di Santo, J.P., 2019. ILC-poiesis: Ensuring tissue ILC differentiation at the right place and time. *European Journal of Immunology* 49, 11–18. <https://doi.org/10.1002/eji.201747294>
- Lim, A.I., Li, Y., Lopez-Lastra, S., Stadhouders, R., Paul, F., Casrouge, A., Serafini, N., Puel, A., Bustamante, J., Surace, L., Masse-Ranson, G., David, E., Strick-Marchand, H., Le Bourhis, L., Cocchi, R., Topazio, D., Graziano, P., Muscarella, L.A., Rogge, L., Norel, X., Sallenave, J.-M., Allez, M., Graf, T., Hendriks, R.W., Casanova, J.-L., Amit, I., Yssel, H., Di Santo, J.P., 2017. Systemic Human ILC Precursors Provide a Substrate for Tissue ILC Differentiation. *Cell* 168, 1086-1100.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.021>
- Limmer, A., Ohl, J., Wingender, G., Berg, M., Jüngerkes, F., Schumak, B., Djandji, D., Scholz, K., Klevenz, A., Hegenbarth, S., Momburg, F., Hämmerling, G.J., Arnold, B., Knolle, P.A., 2005. Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *European Journal of Immunology* 35, 2970–2981. <https://doi.org/10.1002/eji.200526034>
- Lindström, P., 2007. The Physiology of Obese-Hyperglycemic Mice [ob/ob Mice]. *ScientificWorldJournal* 7, 666–685. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.117>
- Listenberger, L.L., Han, X., Lewis, S.E., Cases, S., Farese, R.V., Ory, D.S., Schaffer, J.E., 2003. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3077–3082. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630588100>
- Liu, K., Zhao, E., Ilyas, G., Lalazar, G., Lin, Y., Haseeb, M., Tanaka, K.E., Czaja, M.J., 2015. Impaired macrophage autophagy increases the immune response in obese mice by promoting proinflammatory macrophage polarization. *Autophagy* 11, 271–284. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1009787>
- Liu, L.F., Kodama, K., Wei, K., Tolentino, L.L., Choi, O., Engleman, E.G., Butte, A.J., McLaughlin, T., 2015. The receptor CD44 is associated with systemic insulin resistance and proinflammatory macrophages in human adipose tissue. *Diabetologia* 58, 1579–1586. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3603-y>
- Liu, S., Liu, Z., Shang, A., Xun, J., Lv, Z., Zhou, S., Liu, C., Zhang, Q., Yang, Y., 2023. CD44 is a potential immunotherapeutic target and affects macrophage infiltration leading to poor prognosis. *Sci Rep* 13, 9657. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33915-4>
- Llaó-Cid, L., Roessner, P.M., Chapaprieta, V., Öztürk, S., Roeder, T., Bordas, M., Izcue, A., Colomer, D., Dietrich, S., Stiglbauer, S., Hanna, B., Martín-Subero, J.I., Seiffert, M., 2021. EOMES is essential for antitumor activity of CD8+ T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 35, 3152–3162. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01198-1>
- Llovet, J.M., Kelley, R.K., Villanueva, A., Singal, A.G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J., Finn, R.S., 2021. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 7, 1–28. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
- Loftus, R.M., Assmann, N., Kedia-Mehta, N., O'Brien, K.L., Garcia, A., Gillespie, C., Hukelmann, J.L., Oefner, P.J., Lamond, A.I., Gardiner, C.M., Dettmer, K., Cantrell, D.A., Sinclair, L.V., Finlay, D.K.,

2018. Amino acid-dependent cMyc expression is essential for NK cell metabolic and functional responses in mice. *Nat Commun* 9, 2341. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04719-2>
- Longato, L., 2013. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a tale of fat and sugar? *Fibrogenesis Tissue Repair* 6, 14. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-6-14>
- Lopes, N., Galluso, J., Escalière, B., Carpentier, S., Kerdiles, Y.M., Vivier, E., 2022. Tissue-specific transcriptional profiles and heterogeneity of natural killer cells and group 1 innate lymphoid cells. *Cell Rep Med* 3, 100812. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100812>
- Loyer, X., Paradis, V., Hénique, C., Vion, A.-C., Colnot, N., Guerin, C.L., Devue, C., On, S., Scetbun, J., Romain, M., Paul, J.-L., Rothenberg, M.E., Marcellin, P., Durand, F., Bedossa, P., Prip-Buus, C., Baugé, E., Staels, B., Boulanger, C.M., Tedgui, A., Rautou, P.-E., 2016. Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting PPAR α expression. *Gut* 65, 1882–1894. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308883>
- Luci, C., Bourinet, M., Leclère, P.S., Anty, R., Gual, P., 2020. Chronic Inflammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11, 597648. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.597648>
- Luci, C., Reynders, A., Ivanov, I.I., Cognet, C., Chiche, L., Chasson, L., Hardwigsen, J., Anguiano, E., Banchereau, J., Chaussabel, D., Dalod, M., Littman, D.R., Vivier, E., Tomasello, E., 2009. Influence of the transcription factor ROR γ t on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. *Nat Immunol* 10, 75–82. <https://doi.org/10.1038/ni.1681>
- Luci, C., Vieira, E., Perchet, T., Gual, P., Golub, R., 2019. Natural Killer Cells and Type 1 Innate Lymphoid Cells Are New Actors in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Immunol* 10, 1192. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01192>
- Luck, H., Tsai, S., Chung, J., Clemente-Casares, X., Ghazarian, M., Revelo, X.S., Lei, H., Luk, C.T., Shi, S.Y., Surendra, A., Copeland, J.K., Ahn, J., Prescott, D., Rasmussen, B.A., Chng, M.H.Y., Engleman, E.G., Girardin, S.E., Lam, T.K.T., Croitoru, K., Dunn, S., Philpott, D.J., Guttman, D.S., Woo, M., Winer, S., Winer, D.A., 2015. Regulation of Obesity-Related Insulin Resistance with Gut Anti-inflammatory Agents. *Cell Metabolism* 21, 527–542. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.03.001>
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., Saltiel, A.R., 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117, 175–184. <https://doi.org/10.1172/JCI29881>
- Lynch, L.A., O'Connell, J.M., Kwasnik, A.K., Cawood, T.J., O'Farrelly, C., O'Shea, D.B., 2009. Are Natural Killer Cells Protecting the Metabolically Healthy Obese Patient? *Obesity* 17, 601–605. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.565>
- Ma, C., Kesarwala, A.H., Eggert, T., Medina-Echeverz, J., Kleiner, D.E., Jin, P., Stroncek, D.F., Terabe, M., Kapoor, V., ElGindi, M., Han, M., Thornton, A.M., Zhang, H., Egger, M., Luo, J., Felsner, D.W., McVicar, D.W., Weber, A., Heikenwalder, M., Greten, T.F., 2016. NAFLD causes selective CD4+ T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. *Nature* 531, 253–257. <https://doi.org/10.1038/nature16969>
- Ma, K.L., Ruan, X.Z., Powis, S.H., Chen, Y., Moorhead, J.F., Varghese, Z., 2008. Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice. *Hepatology* 48, 770–781. <https://doi.org/10.1002/hep.22423>
- Ma, S., Cheng, Q., Cai, Y., Gong, H., Wu, Y., Yu, X., Shi, L., Wu, D., Dong, C., Liu, H., 2014. IL-17A Produced by $\gamma\delta$ T Cells Promotes Tumor Growth in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* 74, 1969–1982. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2534>
- Mace, E.M., Wu, W.W., Ho, T., Mann, S.S., Hsu, H.-T., Orange, J.S., 2012. NK Cell Lytic Granules are Highly Motile at the Immunological Synapse and Require F-Actin for Post-degranulation Persistence. *J Immunol* 189, 4870–4880. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201296>
- Machado, M.V., Diehl, A.M., 2016. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 150, 1769–1777. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.066>

- Machado, V., Morais, M., Medeiros, R., 2022. Hyaluronic Acid-Based Nanomaterials Applied to Cancer: Where Are We Now? *Pharmaceutics* 14, 2092. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102092>
- Mah, A.Y., Rashidi, A., Keppel, M.P., Saucier, N., Moore, E.K., Alinger, J.B., Tripathy, S.K., Agarwal, S.K., Jeng, E.K., Wong, H.C., Miller, J.S., Fehniger, T.A., Mace, E.M., French, A.R., Cooper, M.A., 2017. Glycolytic requirement for NK cell cytotoxicity and cytomegalovirus control. *JCI Insight* 2, e95128, 95128. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.95128>
- Mah-Som, A.Y., Keppel, M.P., Tobin, J.M., Kolichski, A., Saucier, N., Sixel, V., French, A.R., Wagner, J.A., Fehniger, T.A., Cooper, M.A., 2021. Reliance on Cox10 and oxidative metabolism for antigen-specific NK cell expansion. *Cell Rep* 35, 109209. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109209>
- Malehmir, M., Pfister, D., Gallage, S., Szydłowska, M., Inverso, D., Kotsiliti, E., Leone, V., Peiseler, M., Surewaard, B.G.J., Rath, D., Ali, A., Wolf, M.J., Drescher, H., Healy, M.E., Dauch, D., Kroy, D., Krenkel, O., Kohlhepp, M., Engleitner, T., Olkus, A., Sijmonsma, T., Volz, J., Deppermann, C., Stegner, D., Helbling, P., Nombela-Arrieta, C., Rafiei, A., Hinterleitner, M., Rall, M., Baku, F., Borst, O., Wilson, C.L., Leslie, J., O'Connor, T., Weston, C.J., Chauhan, A., Adams, D.H., Sheriff, L., Teijeiro, A., Prinz, M., Bogeska, R., Anstee, N., Bongers, M.N., Notohamiprodjo, M., Geisler, T., Withers, D.J., Ware, J., Mann, D.A., Augustin, H.G., Vegiopoulos, A., Milsom, M.D., Rose, A.J., Lalor, P.F., Llovet, J.M., Pinyol, R., Tacke, F., Rad, R., Matter, M., Djouder, N., Kubes, P., Knolle, P.A., Unger, K., Zender, L., Nieswandt, B., Gawaz, M., Weber, A., Heikenwalder, M., 2019. Platelet GPIIb/IIIa is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer. *Nat Med* 25, 641–655. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0379-5>
- Malhi, H., Kaufman, R.J., 2011. Endoplasmic Reticulum Stress in Liver Disease. *J Hepatol* 54, 795–809. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.005>
- Mansouri, A., Gattolliat, C.-H., Asselah, T., 2018. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology* 155, 629–647. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.06.083>
- Mantovani, S., Oliviero, B., Lombardi, A., Varchetta, S., Mele, D., Sangiovanni, A., Rossi, G., Donadon, M., Torzilli, G., Soldani, C., Porta, C., Pedrazzoli, P., Chiellino, S., Santambrogio, R., Opocher, E., Maestri, M., Bernuzzi, S., Rossello, A., Clément, S., De Vito, C., Rubbia-Brandt, L., Negro, F., Mondelli, M.U., 2019. Deficient Natural Killer Cell NKp30-Mediated Function and Altered NCR3 Splice Variants in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 69, 1165–1179. <https://doi.org/10.1002/hep.30235>
- Marçais, A., Cherfils-Vicini, J., Viant, C., Degouve, S., Viel, S., Fenis, A., Rabilloud, J., Mayol, K., Tavares, A., Bienvenu, J., Gangloff, Y.-G., Gilson, E., Vivier, E., Walzer, T., 2014. The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for interleukin-15 signaling during NK cell development and activation. *Nat Immunol* 15, 749–757. <https://doi.org/10.1038/ni.2936>
- Marçais, A., Marotel, M., Degouve, S., Koenig, A., Fauteux-Daniel, S., Drouillard, A., Schlums, H., Viel, S., Besson, L., Allatif, O., Bléry, M., Vivier, E., Bryceson, Y., Thauvat, O., Walzer, T., n.d. High mTOR activity is a hallmark of reactive natural killer cells and amplifies early signaling through activating receptors. *eLife* 6, e26423. <https://doi.org/10.7554/eLife.26423>
- Marçais, A., Viel, S., Grau, M., Henry, T., Marvel, J., Walzer, T., 2013. Regulation of Mouse NK Cell Development and Function by Cytokines. *Frontiers in Immunology* 4.
- Marhaba, R., Freyschmidt-Paul, P., Zöller, M., 2006. In vivo CD44-CD49d complex formation in autoimmune disease has consequences on T cell activation and apoptosis resistance. *European Journal of Immunology* 36, 3017–3032. <https://doi.org/10.1002/eji.200636158>
- Marí, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., Enrich, C., Fernandez-Checa, J.C., García-Ruiz, C., 2006. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metabolism* 4, 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.006>
- Maricic, I., Marrero, I., Eguchi, A., Nakamura, R., Johnson, C.D., Dasgupta, S., Hernandez, C.D., Nguyen, P.S., Swafford, A.D., Knight, R., Feldstein, A.E., Loomba, R., Kumar, V., 2018. Differential activation of hepatic iNKT cell subsets plays a key role in progression of nonalcoholic steatohepatitis. *J Immunol* 201, 3017–3035. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800614>

- Marotel, M., Hasan, U., Viel, S., Marçais, A., Walzer, T., 2016. Back to the drawing board: Understanding the complexity of hepatic innate lymphoid cells. *European Journal of Immunology* 46, 2095–2098. <https://doi.org/10.1002/eji.201646584>
- Marquardt, N., Béziat, V., Nyström, S., Hengst, J., Ivarsson, M.A., Kekäläinen, E., Johansson, H., Mjösberg, J., Westgren, M., Lankisch, T.O., Wedemeyer, H., Ellis, E.C., Ljunggren, H.-G., Michaëlsson, J., Björkström, N.K., 2015. Cutting edge: identification and characterization of human intrahepatic CD49a+ NK cells. *J Immunol* 194, 2467–2471. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402756>
- Marra, F., Tacke, F., 2014. Roles for Chemokines in Liver Disease. *Gastroenterology* 147, 577–594.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.06.043>
- Martin-Armas, M., Simon-Santamaria, J., Pettersen, I., Moens, U., Smedsrød, B., Sveinbjørnsson, B., 2006. Toll-like receptor 9 (TLR9) is present in murine liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and mediates the effect of CpG-oligonucleotides. *Journal of Hepatology* 44, 939–946. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.09.020>
- Matsubara, M., Maruoka, S., Katayose, S., 2002. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *European Journal of Endocrinology* 147, 173–180. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1470173>
- Matsumoto, H., Tamura, S., Kamada, Y., Kiso, S., Fukushima, J., Wada, A., Maeda, N., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Shimomura, I., Hayashi, N., 2006. Adiponectin deficiency exacerbates lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol* 12, 3352–3358. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i21.3352>
- Matsuzawa, N., Takamura, T., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Ando, H., Yokoyama, M., Honda, M., Zen, Y., Nakanuma, Y., Miyamoto, K.-I., Kaneko, S., 2007. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* 46, 1392–1403. <https://doi.org/10.1002/hep.21874>
- McFarland, A.P., Yalin, A., Wang, S.-Y., Cortez, V.S., Landsberger, T., Sudan, R., Peng, V., Miller, H.L., Ricci, B., David, E., Faccio, R., Amit, I., Colonna, M., 2021. Multi-tissue single-cell analysis deconstructs the complex programs of mouse natural killer and type 1 innate lymphoid cells in tissues and circulation. *Immunity* 54, 1320–1337.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.03.024>
- McGlynn, K.A., Petrick, J.L., El-Serag, H.B., 2021. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 73, 4–13. <https://doi.org/10.1002/hep.31288>
- McVey, J.C., Green, B.L., Ruf, B., McCallen, J.D., Wabitsch, S., Subramanyam, V., Diggs, L.P., Heinrich, B., Greten, T.F., Ma, C., 2022. NAFLD indirectly impairs antigen-specific CD8+ T cell immunity against liver cancer in mice. *iScience* 25, 103847. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103847>
- Mehta, H., Lett, M.J., Klenerman, P., Filipowicz Sinnreich, M., 2022. MAIT cells in liver inflammation and fibrosis. *Semin Immunopathol* 44, 429–444. <https://doi.org/10.1007/s00281-022-00949-1>
- Meininger, I., Carrasco, A., Rao, A., Soini, T., Kokkinou, E., Mjösberg, J., 2020. Tissue-Specific Features of Innate Lymphoid Cells. *Trends in Immunology* 41, 902–917. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.08.009>
- Méndez-Sánchez, N., Córdova-Gallardo, J., Barranco-Fragoso, B., Eslam, M., 2021. Hepatic Dendritic Cells in the Development and Progression of Metabolic Steatohepatitis. *Front Immunol* 12, 641240. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.641240>
- Mian, M.F., Lauzon, N.M., Andrews, D.W., Lichty, B.D., Ashkar, A.A., 2010. FimH Can Directly Activate Human and Murine Natural Killer Cells *via* TLR4. *Molecular Therapy* 18, 1379–1388. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.75>
- Miao, C., Yang, Y., He, X., Huang, C., Huang, Y., Zhang, L., Lv, X.-W., Jin, Y., Li, J., 2013. Wnt signaling in liver fibrosis: Progress, challenges and potential directions. *Biochimie, Special section : The Mesenchymal Stem Cell secretome in Regenerative Medicine* 95, 2326–2335. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.003>
- Michelet, X., Dyck, L., Hogan, A., Loftus, R.M., Duquette, D., Wei, K., Beyaz, S., Tavakkoli, A., Foley, C., Donnelly, R., O’Farrelly, C., Raverdeau, M., Vernon, A., Pettee, W., O’Shea, D., Nikolajczyk, B.S.,

- Mills, K.H.G., Brenner, M.B., Finlay, D., Lynch, L., 2018. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. *Nat Immunol* 19, 1330–1340. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0251-7>
- Miele, L., Alberelli, M.A., Martini, M., Liguori, A., Marrone, G., Cocomazzi, A., Vecchio, F.M., Landolfi, R., Gasbarrini, A., Grieco, A., De Candia, E., 2021. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) severity is associated to a nonhemostatic contribution and proinflammatory phenotype of platelets. *Translational Research* 231, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.11.003>
- Mittal, S., El-Serag, H.B., 2013. Epidemiology of HCC: Consider the Population. *J Clin Gastroenterol* 47, S2–S6. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3182872f29>
- Miyachi, Y., Tsuchiya, K., Komiya, C., Shiba, K., Shimazu, N., Yamaguchi, S., Deushi, M., Osaka, M., Inoue, K., Sato, Y., Matsumoto, S., Kikuta, J., Wake, K., Yoshida, M., Ishii, M., Ogawa, Y., 2017. Roles for Cell-Cell Adhesion and Contact in Obesity-Induced Hepatic Myeloid Cell Accumulation and Glucose Intolerance. *Cell Reports* 18, 2766–2779. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.039>
- Miyake, T., Abe, M., Tokumoto, Y., Hirooka, M., Furukawa, S., Kumagi, T., Hamada, M., Kawasaki, K., Tada, F., Ueda, T., Hiasa, Y., Matsuura, B., Onji, M., 2013. B cell-activating factor is associated with the histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 57, 539–547. <https://doi.org/10.1007/s12072-012-9345-8>
- Momen-Heravi, F., Saha, B., Kodys, K., Catalano, D., Satishchandran, A., Szabo, G., 2015. Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcoholic hepatitis. *J Transl Med* 13, 261. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0623-9>
- Montel, A.H., Bochan, M.R., Hobbs, J.A., Lynch, D.H., Brahmi, Z., 1995. Fas Involvement in Cytotoxicity Mediated by Human NK Cells. *Cellular Immunology* 166, 236–246. <https://doi.org/10.1006/cimm.1995.9974>
- Monticelli, L.A., Buck, M.D., Flamar, A.-L., Saenz, S.A., Tait Wojno, E.D., Yudanin, N.A., Osborne, L.C., Hepworth, M.R., Tran, S.V., Rodewald, H.-R., Shah, H., Cross, J.R., Diamond, J.M., Cantu, E., Christie, J.D., Pearce, E.L., Artis, D., 2016. Arginase 1 is an innate lymphoid-cell-intrinsic metabolic checkpoint controlling type 2 inflammation. *Nat Immunol* 17, 656–665. <https://doi.org/10.1038/ni.3421>
- Morath, I., Hartmann, T.N., Orian-Rousseau, V., 2016. CD44: More than a mere stem cell marker. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 81, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009>
- Moreno-Cubero, E., Alrubayyi, A., Balint, S., Ogbe, A., Gill, U.S., Matthews, R., Kinloch, S., Burns, F., Rowland-Jones, S.L., Borrow, P., Schurich, A., Dustin, M., Peppas, D., 2024. IL-15 reprogramming compensates for NK cell mitochondrial dysfunction in HIV-1 infection. *JCI Insight* 9. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.173099>
- Moreno-Fernandez, M.E., Giles, D.A., Oates, J.R., Chan, C.C., Damen, M.S.M.A., Doll, J.R., Stankiewicz, T.E., Chen, X., Chetal, K., Karns, R., Weirauch, M., Romick-Rosendale, L., Xanthakos, S.A., Sheridan, R., Szabo, S., Shah, A.S., Helmuth, M.A., Inge, T.H., Deshmukh, H., Salomonis, N., Divanovic, S., 2021. PKM2-dependent metabolic skewing of hepatic Th17 cells regulates pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Metab* 33, 1187–1204.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.04.018>
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., Moretta, L., 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19, 197–223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.197>
- Moretti, S., Renga, G., Oikonomou, V., Galosi, C., Pariano, M., Iannitti, R.G., Borghi, M., Puccetti, M., De Zuani, M., Pucillo, C.E., Paolicelli, G., Zelante, T., Renauld, J.-C., Bereshchenko, O., Sportoletti, P., Lucidi, V., Russo, M.C., Colombo, C., Fiscarelli, E., Lass-Flörl, C., Majo, F., Ricciotti, G., Ellemunter, H., Ratcliff, L., Talesa, V.N., Napolioni, V., Romani, L., 2017. A mast cell-ILC2-Th9 pathway promotes lung inflammation in cystic fibrosis. *Nat Commun* 8, 14017. <https://doi.org/10.1038/ncomms14017>

- Moschen, A.R., Fritz, T., Clouston, A.D., Rebhan, I., Bauhofer, O., Barrie, H.D., Powell, E.E., Kim, S.-H., Dinarello, C.A., Bartenschlager, R., Jonsson, J.R., Tilg, H., 2011. Interleukin-32: A new proinflammatory cytokine involved in hepatitis C virus-related liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 53, 1819–1829. <https://doi.org/10.1002/hep.24285>
- Mouries, J., Brescia, P., Silvestri, A., Spadoni, I., Sorribas, M., Wiest, R., Mileti, E., Galbiati, M., Invernizzi, P., Adorini, L., Penna, G., Rescigno, M., 2019. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. *J Hepatol* 71, 1216–1228. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.08.005>
- Mózes, F.E., Lee, J.A., Selvaraj, E.A., Jayaswal, A.N.A., Trauner, M., Boursier, J., Fournier, C., Stauffer, K., Stauber, R.E., Bugianesi, E., Younes, R., Gaia, S., Lupşor-Platon, M., Petta, S., Shima, T., Okanou, T., Mahadeva, S., Chan, W.-K., Eddowes, P.J., Hirschfield, G.M., Newsome, P.N., Wong, V.W.-S., de Ledinghen, V., Fan, J., Shen, F., Cobbold, J.F., Sumida, Y., Okajima, A., Schattenberg, J.M., Labenz, C., Kim, W., Lee, M.S., Wiegand, J., Karlas, T., Yilmaz, Y., Aithal, G.P., Palaniyappan, N., Cassinotto, C., Aggarwal, S., Garg, H., Ooi, G.J., Nakajima, A., Yoneda, M., Ziolkowski, M., Barget, N., Geier, A., Tuthill, T., Brosnan, M.J., Anstee, Q.M., Neubauer, S., Harrison, S.A., Bossuyt, P.M., Pavlides, M., 2022. Diagnostic accuracy of non-invasive tests for advanced fibrosis in patients with NAFLD: an individual patient data meta-analysis. *Gut* 71, 1006–1019. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-324243>
- Mrass, P., Kinjyo, I., Ng, L.G., Reiner, S.L., Puré, E., Weninger, W., 2008. CD44 Mediates Successful Interstitial Navigation by Killer T Cells and Enables Efficient Antitumor Immunity. *Immunity* 29, 971–985. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.10.015>
- Muhanna, N., Tair, L.A., Doron, S., Amer, J., Azzeh, M., Mahamid, M., Friedman, S., Safadi, R., 2011. Amelioration of hepatic fibrosis by NK cell activation. *Gut* 60, 90–98. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.211136>
- Muller, W.A., 2016. Transendothelial Migration: Unifying Principles from the Endothelial Perspective. *Immunol Rev* 273, 61–75. <https://doi.org/10.1111/imr.12443>
- Murray, P.J., Wynn, T.A., 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11, 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Nagasawa, M., Spits, H., Ros, X.R., 2018. Innate Lymphoid Cells (ILCs): Cytokine Hubs Regulating Immunity and Tissue Homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a030304. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030304>
- Nagaya, T., Tanaka, N., Komatsu, M., Ichijo, T., Sano, K., Horiuchi, A., Joshita, S., Umemura, T., Matsumoto, A., Yoshizawa, K., Aoyama, T., Kiyosawa, K., Tanaka, E., 2008. Development from simple steatosis to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a 27-year follow-up case. *Clin J Gastroenterol* 1, 116–121. <https://doi.org/10.1007/s12328-008-0017-0>
- Nagoshi, S., 2014. Osteopontin: Versatile modulator of liver diseases. *Hepatology Research* 44, 22–30. <https://doi.org/10.1111/hepr.12166>
- Nakae, D., Mizumoto, Y., Andoh, N., Tamura, K., Horiguchi, K., Endoh, T., Kobayashi, E., Tsujiuchi, T., Denda, A., Lombardi, B., 1995. Comparative changes in the liver of female Fischer-344 rats after short-term feeding of a semipurified or a semisynthetic L-amino acid-defined choline-deficient diet. *Toxicol Pathol* 23, 583–590. <https://doi.org/10.1177/019262339502300504>
- Nandi, A., Estess, P., Siegelman, M., 2004. Bimolecular Complex between Rolling and Firm Adhesion Receptors Required for Cell Arrest: CD44 Association with VLA-4 in T Cell Extravasation. *Immunity* 20, 455–465. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00077-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00077-9)
- Nassir, F., Rector, R.S., Hammoud, G.M., Ibdah, J.A., 2015. Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 11, 167–175.
- Negash, A.A., Olson, R.M., Griffin, S., Gale, M., 2019. Modulation of calcium signaling pathway by hepatitis C virus core protein stimulates NLRP3 inflammasome activation. *PLoS Pathog* 15, e1007593. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007593>
- Neumann, K., Kruse, N., Szilagyi, B., Erben, U., Rudolph, C., Flach, A., Zeitz, M., Hamann, A., Klugewitz, K., 2012. Connecting liver and gut: Murine liver sinusoidal endothelium induces gut tropism of CD4+ T cells via retinoic acid. *Hepatology* 55, 1976–1984. <https://doi.org/10.1002/hep.24816>

- Nevola, R., Epifani, R., Imbriani, S., Tortorella, G., Aprea, C., Galiero, R., Rinaldi, L., Marfella, R., Sasso, F.C., 2023. GLP-1 Receptor Agonists in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Current Evidence and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 24, 1703. <https://doi.org/10.3390/ijms24021703>
- Ni, Y., Zhuge, F., Ni, L., Nagata, N., Yamashita, T., Mukaida, N., Kaneko, S., Ota, T., Nagashimada, M., 2022. CX3CL1/CX3CR1 interaction protects against lipotoxicity-induced nonalcoholic steatohepatitis by regulating macrophage migration and M1/M2 status. *Metabolism* 136, 155272. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155272>
- Ninomiya, M., Kondo, Y., Shimosegawa, T., 2012. Murine Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis. *International Scholarly Research Notices* 2013, e237870. <https://doi.org/10.1155/2013/237870>
- Nixon, B.G., Chou, C., Krishna, C., Dadi, S., Michel, A.O., Cornish, A.E., Kansler, E.R., Do, M.H., Wang, X., Capistrano, K.J., Rudensky, A.Y., Leslie, C.S., Li, M.O., 2022. Cytotoxic granzyme C-expressing ILC1s contribute to antitumor immunity and neonatal autoimmunity. *Science Immunology* 7, eabi8642. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abi8642>
- Nobarani, S., Alaei-Shahmiri, F., Aghili, R., Malek, M., Poustchi, H., Lahouti, M., Khamseh, M.E., 2022. Visceral Adipose Tissue and Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Type 2 Diabetes. *Dig Dis Sci* 67, 1389–1398. <https://doi.org/10.1007/s10620-021-06953-z>
- Novikova, M.V., Khromova, N.V., Kopnin, P.B., 2017. Components of the Hepatocellular Carcinoma Microenvironment and Their Role in Tumor Progression. *Biochemistry (Mosc)* 82, 861–873. <https://doi.org/10.1134/S0006297917080016>
- Nussbaum, J.C., Van Dyken, S.J., von Moltke, J., Cheng, L.E., Mohapatra, A., Molofsky, A.B., Thornton, E.E., Krummel, M.F., Chawla, A., Liang, H.-E., Locksley, R.M., 2013. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* 502, 245–248. <https://doi.org/10.1038/nature12526>
- O'Brien, K.L., Finlay, D.K., 2019. Immunometabolism and natural killer cell responses. *Nat Rev Immunol* 19, 282–290. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0139-2>
- Obstfeld, A.E., Sugaru, E., Thearle, M., Francisco, A.-M., Gayet, C., Ginsberg, H.N., Ables, E.V., Ferrante, A.W., 2010. C-C Chemokine Receptor 2 (CCR2) Regulates the Hepatic Recruitment of Myeloid Cells That Promote Obesity-Induced Hepatic Steatosis. *Diabetes* 59, 916–925. <https://doi.org/10.2337/db09-1403>
- Ochoa, M.C., Minute, L., Rodriguez, I., Garasa, S., Perez-Ruiz, E., Inogés, S., Melero, I., Berraondo, P., 2017. Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunology & Cell Biology* 95, 347–355. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.6>
- Ogura, Y., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., 2006. The Inflammasome: First Line of the Immune Response to Cell Stress. *Cell* 126, 659–662. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.002>
- Øie, C.I., Wolfson, D.L., Yasunori, T., Dumitriu, G., Sørensen, K.K., McCourt, P.A., Ahluwalia, B.S., Smedsrød, B., 2020. Liver sinusoidal endothelial cells contribute to the uptake and degradation of entero bacterial viruses. *Sci Rep* 10, 898. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57652-0>
- Omenetti, A., Choi, S., Michelotti, G., Diehl, A.M., 2011. Hedgehog Signaling in the Liver. *J Hepatol* 54, 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.10.003>
- O'Neill, L.A.J., Kishton, R.J., Rathmell, J., 2016. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* 16, 553–565. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.70>
- O'Shea, D., Cawood, T.J., O'Farrelly, C., Lynch, L., 2010. Natural Killer Cells in Obesity: Impaired Function and Increased Susceptibility to the Effects of Cigarette Smoke. *PLoS One* 5, e8660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008660>
- Ou, R., Liu, J., Lv, M., Wang, Jingying, Wang, Jinmeng, Zhu, L., Zhao, L., Xu, Y., 2017. Neutrophil depletion improves diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Endocrine* 57, 72–82. <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1323-4>
- Pagire, H.S., Pagire, S.H., Jeong, B., Choi, W.-I., Oh, C.J., Lim, C.W., Kim, M., Yoon, J., Kim, S.S., Bae, M.A., Jeon, J.-H., Song, S., Lee, H.J., Lee, E.Y., Goughnour, P.C., Kim, D., Lee, I.-K., Loomba, R., Kim, H., Ahn, J.H., 2024. Discovery of a peripheral 5HT2A antagonist as a clinical candidate for metabolic dysfunction-associated steatohepatitis. *Nat Commun* 15, 645. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44874-3>

- Pai, R.K., Kleiner, D.E., Hart, J., Adeyi, O.A., Clouston, A.D., Behling, C.A., Jain, D., Kakar, S., Brahmania, M., Burgart, L., Batts, K.P., Valasek, M.A., Torbenson, M.S., Guindi, M., Wang, H.L., Ajmera, V., Adams, L.A., Parker, C.E., Feagan, B.G., Loomba, R., Jairath, V., 2019. Standardizing the interpretation of liver biopsies in non-alcoholic fatty liver disease clinical trials. *Aliment Pharmacol Ther* 50, 1100–1111. <https://doi.org/10.1111/apt.15503>
- Pal, A., Barber, T.M., Van de Bunt, M., Rudge, S.A., Zhang, Q., Lachlan, K.L., Cooper, N.S., Linden, H., Levy, J.C., Wakelam, M.J.O., Walker, L., Karpe, F., Gloyn, A.L., 2012. PTEN Mutations as a Cause of Constitutive Insulin Sensitivity and Obesity. *N Engl J Med* 367, 1002–1011. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113966>
- Pan, X., Cao, H., Lu, J., Shu, X., Xiong, X., Hong, X., Xu, Q., Zhu, H., Li, G., Shen, G., 2011. Interleukin-32 expression induced by hepatitis B virus protein X is mediated through activation of NF- κ B. *Molecular Immunology* 48, 1573–1577. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.03.012>
- Pandey, E., Nour, A.S., Harris, E.N., 2020. Prominent Receptors of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Liver Homeostasis and Disease. *Front Physiol* 11, 873. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00873>
- Papaioannou, S., See, J.-X., Jeong, M., De La Torre, C., Ast, V., Reiners-Koch, P.-S., Sati, A., Mogler, C., Platten, M., Cerwenka, A., Stojanovic, A., 2023. Liver sinusoidal endothelial cells orchestrate NK cell recruitment and activation in acute inflammatory liver injury. *Cell Rep* 42, 112836. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112836>
- Pasarín, M., La Mura, V., Gracia-Sancho, J., García-Calderó, H., Rodríguez-Vilarrupla, A., García-Pagán, J.C., Bosch, J., Abraldes, J.G., 2012. Sinusoidal Endothelial Dysfunction Precedes Inflammation and Fibrosis in a Model of NAFLD. *PLoS One* 7, e32785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032785>
- Patouraux, S., Bonnafous, S., Voican, C.S., Anty, R., Saint-Paul, M.-C., Rosenthal-Allieri, M.-A., Agostini, H., Njike, M., Barri-Ova, N., Naveau, S., Marchand-Brustel, Y.L., Veillon, P., Calès, P., Perlemuter, G., Tran, A., Gual, P., 2012. The Osteopontin Level in Liver, Adipose Tissue and Serum Is Correlated with Fibrosis in Patients with Alcoholic Liver Disease. *PLOS ONE* 7, e35612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035612>
- Patouraux, S., Rousseau, D., Bonnafous, S., Lebeaupin, C., Luci, C., Canivet, C.M., Schneck, A.-S., Bertola, A., Saint-Paul, M.-C., Iannelli, A., Gugenheim, J., Anty, R., Tran, A., Bailly-Maitre, B., Gual, P., 2017. CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology* 67, 328–338. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.003>
- Pearce, E.L., Mullen, A.C., Martins, G.A., Krawczyk, C.M., Hutchins, A.S., Zediak, V.P., Banica, M., DiCioccio, C.B., Gross, D.A., Mao, C.-A., Shen, H., Cereb, N., Yang, S.Y., Lindsten, T., Rossant, J., Hunter, C.A., Reiner, S.L., 2003. Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* 302, 1041–1043. <https://doi.org/10.1126/science.1090148>
- Peiseler, M., Araujo David, B., Zindel, J., Surewaard, B.G.J., Lee, W.-Y., Heymann, F., Nusse, Y., Castanheira, F.V.S., Shim, R., Guillot, A., Bruneau, A., Atif, J., Perciani, C., Ohland, C., Ganguli Mukherjee, P., Niehrs, A., Thuenauer, R., Altfeld, M., Amrein, M., Liu, Z., Gordon, P.M.K., McCoy, K., Deniset, J., MacParland, S., Ginhoux, F., Tacke, F., Kubes, P., 2023. Kupffer cell-like syncytia replenish resident macrophage function in the fibrotic liver. *Science* 381, eabq5202. <https://doi.org/10.1126/science.abq5202>
- Pfister, D., Núñez, N.G., Pinyol, R., Govaere, O., Pinter, M., Szydłowska, M., Gupta, R., Qiu, M., Deczkowska, A., Weiner, A., Müller, F., Sinha, A., Friebel, E., Engleitner, T., Lenggenhager, D., Moncsek, A., Heide, D., Stirm, K., Kosla, J., Kotsiliti, E., Leone, V., Dudek, M., Yousuf, S., Inverso, D., Singh, I., Teijeiro, A., Castet, F., Montironi, C., Haber, P.K., Tiniakos, D., Bedossa, P., Cockell, S., Younes, R., Vacca, M., Marra, F., Schattenberg, J.M., Allison, M., Bugianesi, E., Ratzl, V., Pressiani, T., D'Alessio, A., Personeni, N., Rimassa, L., Daly, A.K., Scheiner, B., Pomej, K., Kirstein, M.M., Vogel, A., Peck-Radosavljevic, M., Hucke, F., Finkelmeier, F., Waidmann, O., Trojan, J., Schulze, K., Wege, H., Koch, S., Weinmann, A., Bueter, M., Rössler, F., Siebenhüner, A., De Dosso, S., Mallm, J.-P., Umansky, V., Jugold, M., Luedde, T., Schietinger, A., Schirmacher, P., Emu, B., Augustin, H.G., Billeter, A., Müller-Stich, B., Kikuchi, H., Duda, D.G., Kütting, F., Waldschmidt, D.-

- T., Ebert, M.P., Rahbari, N., Mei, H.E., Schulz, A.R., Ringelhan, M., Malek, N., Spahn, S., Bitzer, M., Ruiz de Galarreta, M., Lujambio, A., Dufour, J.-F., Marron, T.U., Kaseb, A., Kudo, M., Huang, Y.-H., Djouder, N., Wolter, K., Zender, L., Marche, P.N., Decaens, T., Pinato, D.J., Rad, R., Mertens, J.C., Weber, A., Unger, K., Meissner, F., Roth, S., Jilkova, Z.M., Claassen, M., Anstee, Q.M., Amit, I., Knolle, P., Becher, B., Llovet, J.M., Heikenwalder, M., 2021. NASH limits anti-tumour surveillance in immunotherapy-treated HCC. *Nature* 592, 450–456. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03362-0>
- Pionnier, N., Furlong-Silva, J., Colombo, S.A.P., Marriott, A.E., Chunda, V.C., Ndzheshang, B.L., Sjoberg, H., Archer, J., Steven, A., Wanji, S., Taylor, M.J., Turner, J.D., 2022. NKp46+ natural killer cells develop an activated/memory-like phenotype and contribute to innate immunity against experimental filarial infection. *Front Immunol* 13, 969340. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.969340>
- Pirola, C.J., Gianotti, T.F., Castaño, G.O., Mallardi, P., Martino, J.S., Ledesma, M.M.G.L., Flichman, D., Mirshahi, F., Sanyal, A.J., Sookoian, S., 2015. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut* 64, 800–812. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306996>
- Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., Rautou, P.-E., 2017. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology* 66, 212–227. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009>
- Ponta, H., Sherman, L., Herrlich, P.A., 2003. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 33–45. <https://doi.org/10.1038/nrm1004>
- Prager, I., Watzl, C., 2019. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology* 105, 1319–1329. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-269R>
- Praper, T., Beseničar, M.P., Istinič, H., Podlesek, Z., Metkar, S.S., Froelich, C.J., Anderluh, G., 2010. Human perforin permeabilizing activity, but not binding to lipid membranes, is affected by pH. *Molecular Immunology* 47, 2492–2504. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.06.001>
- Procaccini, C., Jirillo, E., Matarese, G., 2012. Leptin as an immunomodulator. *Molecular Aspects of Medicine, Nutritional Immunology* 33, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.012>
- Pulli, B., Ali, M., Iwamoto, Y., Zeller, M.W.G., Schob, S., Linnoila, J.J., Chen, J.W., 2015. Myeloperoxidase–Hepatocyte–Stellate Cell Cross Talk Promotes Hepatocyte Injury and Fibrosis in Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis. *Antioxid Redox Signal* 23, 1255–1269. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6108>
- Radaeva, S., Sun, R., Jaruga, B., Nguyen, V.T., Tian, Z., 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. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.10.055>
- Rahman, K., Desai, C., Iyer, S.S., Thorn, N.E., Kumar, P., Liu, Y., Smith, T., Neish, A.S., Li, H., Tan, S., Wu, P., Liu, X., Yu, Y., Farris, A.B., Nusrat, A., Parkos, C.A., Anania, F.A., 2016. Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology* 151, 733–746.e12. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.06.022>
- Raja, S.M., Wang, B., Dantuluri, M., Desai, U.R., Demeler, B., Spiegel, K., Metkar, S.S., Froelich, C.J., 2002. Cytotoxic Cell Granule-mediated Apoptosis: CHARACTERIZATION OF THE MACROMOLECULAR COMPLEX OF GRANZYME B WITH SERGLYCIN*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 49523–49530. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209607200>
- Rajoriya, N., Fergusson, J.R., Leithead, J.A., Klenerman, P., 2014. Gamma Delta T-lymphocytes in Hepatitis C and Chronic Liver Disease. *Frontiers in Immunology* 5.
- Ramachandran, P., Dobie, R., Wilson-Kanamori, J., Dora, E., Henderson, B., Luu, N., Portman, J., Matchett, K., Brice, M., Marwick, J., Taylor, R., Efremova, M., Vento-Tormo, R., Carragher, N., Kendall, T., Fallowfield, J., Harrison, E., Mole, D., Wigmore, S., Newsome, P., Weston, C., Iredale, J., Tacke, F., Pollard, J., Ponting, C., Marioni, J., Teichmann, S., Henderson, N., 2019. Resolving

- the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single cell level. *Nature* 575, 512–518. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1631-3>
- 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., Williams, M.J., Dunbar, D.R., Manning, J.R., van Rooijen, N., Fallowfield, J.A., Forbes, S.J., Iredale, J.P., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119964109>
- Ratziu, V., Harrison, S.A., Hajji, Y., Magnanensi, J., Petit, S., Majd, Z., Delecroix, E., Rosenquist, C., Hum, D., Staels, B., Anstee, Q.M., Sanyal, A.J., 2024. NIS2+TM as a screening tool to optimize patient selection in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis clinical trials. *Journal of Hepatology* 80, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.10.038>
- Rau, M., Schilling, A.-K., Meertens, J., Hering, I., Weiss, J., Jurowich, C., Kudlich, T., Hermanns, H.M., Bantel, H., Beyersdorf, N., Geier, A., 2016. Progression from Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis Is Marked by a Higher Frequency of Th17 Cells in the Liver and an Increased Th17/Resting Regulatory T Cell Ratio in Peripheral Blood and in the Liver. *The Journal of Immunology* 196, 97–105. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501175>
- Remmerie, A., Martens, L., Thoné, T., Castoldi, A., Seurinck, R., Pavie, B., Roels, J., Vanneste, B., De Prijck, S., Vanhockerhout, M., Binte Abdul Latib, M., Devisscher, L., Hoorens, A., Bonnardel, J., Vandamme, N., Kremer, A., Borghgraef, P., Van Vlierberghe, H., Lippens, S., Pearce, E., Saeys, Y., Scott, C.L., 2020. Osteopontin Expression Identifies a Subset of Recruited Macrophages Distinct from Kupffer Cells in the Fatty Liver. *Immunity* 53, 641-657.e14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.08.004>
- Ren, T., Zhu, J., Zhu, L., Cheng, M., 2017. The Combination of Blueberry Juice and Probiotics Ameliorate Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) by Affecting SREBP-1c/PNPLA-3 Pathway via PPAR- α . *Nutrients* 9, 198. <https://doi.org/10.3390/nu9030198>
- Renehan, A.G., Zwahlen, M., Egger, M., 2015. Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nat Rev Cancer* 15, 484–498. <https://doi.org/10.1038/nrc3967>
- Renukaradhya, G.J., Khan, M.A., Vieira, M., Du, W., Gervay-Hague, J., Brutkiewicz, R.R., 2008. Type I NKT cells protect (and type II NKT cells suppress) the host's innate antitumor immune response to a B-cell lymphoma. *Blood* 111, 5637–5645. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-092866>
- Reynders, A., Yessaad, N., Vu Manh, T.-P., Dalod, M., Fenis, A., Aubry, C., Nikitas, G., Escalière, B., Renauld, J.C., Dussurget, O., Cossart, P., Lecuit, M., Vivier, E., Tomasello, E., 2011. Identity, regulation and in vivo function of gut NKp46+ROR γ t+ and NKp46+ROR γ t- lymphoid cells. *EMBO J* 30, 2934–2947. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.201>
- Riazi, K., Azhari, H., Charette, J.H., Underwood, F.E., King, J.A., Afshar, E.E., Swain, M.G., Congly, S.E., Kaplan, G.G., Shaheen, A.-A., 2022. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 7, 851–861. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00165-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00165-0)
- Riggan, L., Freud, A.G., O'Sullivan, T.E., 2019. True Detective: Unraveling Group 1 Innate Lymphocyte Heterogeneity. *Trends Immunol* 40, 909–921. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.08.005>
- Rinella, M.E., 2015. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *JAMA* 313, 2263. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.5370>
- Rizk, J., Mörbe, U.M., Agerholm, R., Baglioni, M.V., Catafal Tardos, E., Fares da Silva, M.G.F., Ulmert, I., Kadekar, D., Viñals, M.T., Bekiaris, V., 2023. The cIAP ubiquitin ligases sustain type 3 $\gamma\delta$ T cells and ILC during aging to promote barrier immunity. *J Exp Med* 220, e20221534. <https://doi.org/10.1084/jem.20221534>
- Robert, S., Gicquel, T., Victoni, T., Valença, S., Barreto, E., Bailly-Maître, B., Boichot, E., Lagente, V., 2016. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis. *Biosci Rep* 36, e00360. <https://doi.org/10.1042/BSR20160107>
- Roderfeld, M., 2018. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis. *Matrix Biology, SI: Fibrosis – Mechanisms and Translational Aspects* 68–69, 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.11.011>

- Roehlen, N., Crouchet, E., Baumert, T.F., 2020. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells* 9, 875. <https://doi.org/10.3390/cells9040875>
- Roh, J.S., Sohn, D.H., 2018. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw* 18, e27. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27>
- Rostami, S., Parsian, H., 2013. Hyaluronic Acid: From Biochemical Characteristics to its Clinical Translation in Assessment of Liver Fibrosis. *Hepat Mon* 13, e13787. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.13787>
- Rotundo, L., Persaud, A., Feurdean, M., Ahlawat, S., Kim, H., 2018. The association of leptin with severity of non-alcoholic fatty liver disease: A population-based study. *Clin Mol Hepatol* 24, 392–401. <https://doi.org/10.3350/cmh.2018.0011>
- Rowe, I.A., Galsinh, S.K., Wilson, G.K., Parker, R., Durant, S., Lazar, C., Branza-Nichita, N., Bicknell, R., Adams, D.H., Balfe, P., McKeating, J.A., 2014. Paracrine Signals From Liver Sinusoidal Endothelium Regulate Hepatitis C Virus Replication. *Hepatology* 59, 375–384. <https://doi.org/10.1002/hep.26571>
- Roy, R., Chatterjee, N., Khan, M.S., Sultana, F., Roy, A., Naskar, S., Guha, R., Sen, S., Chakrabarti, J., Chatterjee, B.P., Panda, C.K., Dutta, S., 2024. High prevalence of CD44 and its ligand low molecular weight hyaluronan in plasma of HNSCC patients: clinical significance. *Mol Biol Rep* 51, 157. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08950-z>
- Ruppert, S.M., Hawn, T.R., Arrigoni, A., Wight, T.N., Bollyky, P.L., 2014. Tissue integrity signals communicated by high-molecular weight hyaluronan and the resolution of inflammation. *Immunol Res* 58, 186–192. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8495-2>
- Saely, C.H., Geiger, K., Drexel, H., 2012. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology* 58, 15–23. <https://doi.org/10.1159/000321319>
- Saikh, K.U., Lee, J.S., Kissner, T.L., Dyas, B., Ulrich, R.G., 2003. Toll-like receptor and cytokine expression patterns of CD56+ T cells are similar to natural killer cells in response to infection with Venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J Infect Dis* 188, 1562–1570. <https://doi.org/10.1086/379196>
- Salzberger, W., Martrus, G., Bachmann, K., Goebels, H., Heß, L., Koch, M., Langeneckert, A., Lunemann, S., Oldhafer, K.J., Pfeifer, C., Poch, T., Richert, L., Schramm, C., Wahib, R., Bunders, M.J., Altfeld, M., 2018. Tissue-resident NK cells differ in their expression profile of the nutrient transporters Glut1, CD98 and CD71. *PLoS One* 13, e0201170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201170>
- Sans, A., Bonnafeous, S., Rousseau, D., Patouraux, S., Canivet, C.M., Leclere, P.S., Tran-Van-Nhieu, J., Luci, C., Bailly-Maitre, B., Xu, X., Lee, A.-H., Minehira, K., Anty, R., Tran, A., Iannelli, A., Gual, P., 2019. The Differential Expression of Cide Family Members is Associated with Nafld Progression from Steatosis to Steatohepatitis. *Sci Rep* 9, 7501. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43928-7>
- Santhekadur, P.K., Kumar, D.P., Sanyal, A.J., 2018. PRECLINICAL MODELS OF NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. *J Hepatol* 68, 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.10.031>
- Sanyal, A.J., Ratziu, V., Loomba, R., Anstee, Q.M., Kowdley, K.V., Rinella, M.E., Sheikh, M.Y., Trotter, J.F., Knapple, W., Lawitz, E.J., Abdelmalek, M.F., Newsome, P.N., Boursier, J., Mathurin, P., Dufour, J.-F., Berrey, M.M., Shiff, S.J., Sawhney, S., Capozza, T., Leyva, R., Harrison, S.A., Younossi, Z.M., 2023. Results from a new efficacy and safety analysis of the REGENERATE trial of obeticholic acid for treatment of pre-cirrhotic fibrosis due to non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology* 79, 1110–1120. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.07.014>
- Sardinha, L.R., Elias, R.M., Mosca, T., Bastos, K.R.B., Marinho, C.R.F., D'Império Lima, M.R., Álvarez, J.M., 2006. Contribution of NK, NK T, $\gamma\delta$ T, and $\alpha\beta$ T Cells to the Gamma Interferon Response Required for Liver Protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 74, 2031–2042. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2031-2042.2006>
- Satoh-Takayama, N., Vosschenrich, C.A.J., Lesjean-Pottier, S., Sawa, S., Lochner, M., Rattis, F., Mention, J.-J., Thiam, K., Cerf-Bensussan, N., Mandelboim, O., Eberl, G., Di Santo, J.P., 2008. Microbial Flora Drives Interleukin 22 Production in Intestinal NKp46+ Cells that Provide Innate Mucosal Immune Defense. *Immunity* 29, 958–970. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.001>

- Schierwagen, R., Maybüchen, L., Zimmer, S., Hittatiya, K., Bäck, C., Klein, S., Uschner, F.E., Reul, W., Boor, P., Nickenig, G., Strassburg, C.P., Trautwein, C., Plat, J., Lütjohann, D., Sauerbruch, T., Tacke, F., Trebicka, J., 2015. Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis. *Sci Rep* 5, 12931. <https://doi.org/10.1038/srep12931>
- Schmidt, S.V., Nino-Castro, A.C., Schultze, J.L., 2012. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Front. Immunol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00274>
- Schroeder, B.O., Birchenough, G.M.H., Ståhlman, M., Arike, L., Johansson, M.E.V., Hansson, G.C., Bäckhed, F., 2018. Bifidobacteria or Fiber Protects against Diet-Induced Microbiota-Mediated Colonic Mucus Deterioration. *Cell Host Microbe* 23, 27-40.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.004>
- Schulze, R.J., Schott, M.B., Casey, C.A., Tuma, P.L., McNiven, M.A., 2019. The cell biology of the hepatocyte: A membrane trafficking machine. *J Cell Biol* 218, 2096–2112. <https://doi.org/10.1083/jcb.201903090>
- Schuppan, D., Afdhal, N.H., 2008. Liver cirrhosis. *The Lancet* 371, 838–851. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60383-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60383-9)
- Schweiger, M., Romauch, M., Schreiber, R., Grabner, G.F., Hütter, S., Kotzbeck, P., Benedikt, P., Eichmann, T.O., Yamada, S., Knittelfelder, O., Diwoky, C., Doler, C., Mayer, N., De Cecco, W., Breinbauer, R., Zimmermann, R., Zechner, R., 2017. Pharmacological inhibition of adipose triglyceride lipase corrects high-fat diet-induced insulin resistance and hepatosteatosis in mice. *Nat Commun* 8, 14859. <https://doi.org/10.1038/ncomms14859>
- Scott, C.L., Williams, M., 2018. Hepatology Snapshot: The role of Kupffer cells in hepatic iron and lipid metabolism. *J Hepatol* 69, 1197–1199. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.02.013>
- Scott, C.L., Zheng, F., De Baetselier, P., Martens, L., Saeys, Y., De Prijck, S., Lippens, S., Abels, C., Schoonooghe, S., Raes, G., Devoogdt, N., Lambrecht, B.N., Beschin, A., Williams, M., 2016. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat Commun* 7, 10321. <https://doi.org/10.1038/ncomms10321>
- Scoville, S.D., Freud, A.G., Caligiuri, M.A., 2019. Cellular pathways in the development of human and murine innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol* 56, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.11.003>
- Sedimbi, S.K., Hägglöf, T., Garimella, M.G., Wang, S., Duhlin, A., Coelho, A., Ingelshed, K., Mondoc, E., Malin, S.G., Holmdahl, R., Lane, D.P., Leadbetter, E.A., Karlsson, M.C.I., 2020. Combined proinflammatory cytokine and cognate activation of invariant natural killer T cells enhances anti-DNA antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 9054–9063. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920463117>
- Seidman, J.S., Troutman, T.D., Sakai, M., Gola, A., Spann, N.J., Bennett, H., Bruni, C.M., Ouyang, Z., Li, R.Z., Sun, X., Vu, B.T., Pasillas, M.P., Ego, K.M., Gosselin, D., Link, V.M., Chong, L.-W., Evans, R.M., Thompson, B.M., McDonald, J.G., Hosseini, M., Witztum, J.L., Germain, R.N., Glass, C.K., 2020. Niche-Specific Re-Programming of Epigenetic Landscapes Drives Myeloid Cell Diversity in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Immunity* 52, 1057-1074.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.001>
- Seillet, C., Brossay, L., Vivier, E., 2021. Natural killers or ILC1s? That is the question. *Current opinion in immunology* 68, 48. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.08.009>
- Seki, E., Schwabe, R.F., 2015. Hepatic Inflammation and Fibrosis: Functional Links and Key Pathways. *Hepatology* 61, 1066–1079. <https://doi.org/10.1002/hep.27332>
- Seo, W., Eun, H.S., Kim, S.Y., Yi, H.-S., Lee, Y.-S., Park, S.-H., Jang, M.-J., Jo, E., Kim, S.C., Han, Y.-M., Park, K.-G., Jeong, W.-I., 2016. Exosome-mediated activation of toll-like receptor 3 in stellate cells stimulates interleukin-17 production by $\gamma\delta$ T cells in liver fibrosis. *Hepatology* 64, 616–631. <https://doi.org/10.1002/hep.28644>
- Serafini, N., Voshenrich, C.A.J., Di Santo, J.P., 2015. Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat Rev Immunol* 15, 415–428. <https://doi.org/10.1038/nri3855>

- Shabalala, S.C., Dlodla, P.V., Mabasa, L., Kappo, A.P., Basson, A.K., Pheiffer, C., Johnson, R., 2020. The effect of adiponectin in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and the potential role of polyphenols in the modulation of adiponectin signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 131, 110785. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110785>
- Shannon, J.P., Vrba, S.M., Reynoso, G.V., Wynne-Jones, E., Kamenyeva, O., Malo, C.S., Cherry, C.R., McManus, D.T., Hickman, H.D., 2021. Group 1 Innate Lymphoid Cell-Derived Interferon- γ Maintains Anti-Viral Vigilance in the Mucosal Epithelium. *Immunity* 54, 276-290.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.12.004>
- Shen, Y., Malik, S.A., Amir, M., Kumar, P., Cingolani, F., Wen, J., Liu, Y., Zhao, E., Farris, A.B., Raeman, R., Czaja, M.J., 2020. Decreased Hepatocyte Autophagy Leads to Synergistic IL-1 β and TNF Mouse Liver Injury and Inflammation. *Hepatology* 72, 595–608. <https://doi.org/10.1002/hep.31209>
- Sheng, W., Ji, G., Zhang, L., 2022. The Effect of Lithocholic Acid on the Gut-Liver Axis. *Front Pharmacol* 13, 910493. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.910493>
- Shetty, S., Lalor, P.F., Adams, D.H., 2018. Liver sinusoidal endothelial cells — gatekeepers of hepatic immunity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15, 555–567. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0020-y>
- Shin, E., Bak, S.H., Park, T., Kim, J.W., Yoon, S.-R., Jung, H., Noh, J.-Y., 2023. Understanding NK cell biology for harnessing NK cell therapies: targeting cancer and beyond. *Front. Immunol.* 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1192907>
- Shiromizu, C.M., Jancic, C.C., 2018. $\gamma\delta$ T Lymphocytes: An Effector Cell in Autoimmunity and Infection. *Front Immunol* 9, 2389. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02389>
- Siegelman, M.H., Stanescu, D., Estess, P., 2000. The CD44-initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. *J Clin Invest* 105, 683–691. <https://doi.org/10.1172/JCI8692>
- Sinakos, E., Liava, C., Loomba, R., 2022. Emerging advances in the pharmacologic treatment of nonalcoholic steatohepatitis and related cirrhosis. *Ann Gastroenterol* 35, 213–225. <https://doi.org/10.20524/aog.2022.0704>
- Slattery, K., Woods, E., Zaiatz-Bittencourt, V., Marks, S., Chew, S., Conroy, M., Goggin, C., MacEochagain, C., Kennedy, J., Lucas, S., Finlay, D.K., Gardiner, C.M., 2021. TGF β drives NK cell metabolic dysfunction in human metastatic breast cancer. *J Immunother Cancer* 9, e002044. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-002044>
- Sneath, R.J., Mangham, D.C., 1998. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Molecular Pathology* 51, 191. <https://doi.org/10.1136/mp.51.4.191>
- Song, C., Lee, J.S., Gilfillan, S., Robinette, M.L., Newberry, R.D., Stappenbeck, T.S., Mack, M., Cella, M., Colonna, M., 2015. Unique and redundant functions of NKp46+ ILC3s in models of intestinal inflammation. *J Exp Med* 212, 1869–1882. <https://doi.org/10.1084/jem.20151403>
- Song, C., Long, X., He, J., Huang, Y., 2023. Recent evaluation about inflammatory mechanisms in nonalcoholic fatty liver disease. *Frontiers in Pharmacology* 14.
- Sørensen, K.K., Simon-Santamaria, J., McCuskey, R.S., Smedsrød, B., 2015. Liver Sinusoidal Endothelial Cells, in: *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1751–1774. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140078>
- Soysouvanh, F., Rousseau, D., Bonnafous, S., Bourinet, M., Strazzulla, A., Patouraux, S., Machowiak, J., Farrugia, M.A., Iannelli, A., Tran, A., Anty, R., Luci, C., Gual, P., 2023. Osteopontin-driven T-cell accumulation and function in adipose tissue and liver promoted insulin resistance and MAFLD. *Obesity* 31, 2568–2582. <https://doi.org/10.1002/oby.23868>
- Spiers, J., Brindley, J.H., Li, W., Alazawi, W., 2022. What's new in non-alcoholic fatty liver disease? *Frontline Gastroenterol* 13, e102–e108. <https://doi.org/10.1136/flgastro-2022-102122>
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F., Vivier, E., 2013. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13, 145–149. <https://doi.org/10.1038/nri3365>

- Spruss, A., Kanuri, G., Wagnerberger, S., Haub, S., Bischoff, S.C., Bergheim, I., 2009. Toll-Like Receptor 4 Is Involved in the Development of Fructose-Induced Hepatic Steatosis in Mice†. *Hepatology* 50, 1094. <https://doi.org/10.1002/hep.23122>
- Stegmann, K.A., Robertson, F., Hansi, N., Gill, U., Pallant, C., Christophides, T., Pallett, L.J., Peppas, D., Dunn, C., Fusai, G., Male, V., Davidson, B.R., Kennedy, P., Maini, M.K., 2016. CXCR6 marks a novel subset of T-bet^{lo}Eomesin^{hi} natural killer cells residing in human liver. *Sci Rep* 6, 26157. <https://doi.org/10.1038/srep26157>
- Stiglund, N., Strand, K., Cornillet, M., Stål, P., Thorell, A., Zimmer, C.L., Näslund, E., Karlgren, S., Nilsson, H., Mellgren, G., Fernø, J., Hagström, H., Björkström, N.K., 2019. Retained NK Cell Phenotype and Functionality in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in Immunology* 10.
- Stinchcombe, J.C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., Griffiths, G.M., 2006. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443, 462–465. <https://doi.org/10.1038/nature05071>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Sutton, V.R., Davis, J.E., Cancilla, M., Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Sedelies, K., Browne, K.A., Trapani, J.A., 2000. Initiation of Apoptosis by Granzyme B Requires Direct Cleavage of Bid, but Not Direct Granzyme B–Mediated Caspase Activation. *J Exp Med* 192, 1403–1414.
- Svegliati-Baroni, G., Candelaresi, C., Saccomanno, S., Ferretti, G., Bachetti, T., Marziani, M., De Minicis, S., Nobili, L., Salzano, R., Omenetti, A., Pacetti, D., Sigmund, S., Benedetti, A., Casini, A., 2006. A Model of Insulin Resistance and Nonalcoholic Steatohepatitis in Rats. *Am J Pathol* 169, 846–860. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050953>
- Syn, W.-K., Agboola, K.M., Swiderska, M., Michelotti, G., Liaskou, E., Pang, H., Xie, G., Philips, G., Chan, I.S., Karaca, G.F., Pereira, T.A., Chen, Y., Mi, Z., Kuo, P.C., Choi, S.S., Guy, C.D., Abdelmalek, M.F., Diehl, A.M., 2012. NKT associated Hedgehog and Osteopontin drive fibrogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. *Gut* 61, 1323–1329. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301857>
- Syn, W.-K., Oo, Y.H., Pereira, T.A., Karaca, G.F., Jung, Y., Omenetti, A., Witek, R.P., Choi, S.S., Guy, C.D., Fearing, C.M., Teaberry, V., Pereira, F.E.L., Adams, D.H., Diehl, A.M., 2010. Accumulation of NKT cells in Progressive Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* 51, 1998–2007. <https://doi.org/10.1002/hep.23599>
- Szabo, G., 2021. Exosomes and MicroRNA-223 at the Intersection of Inflammation and Fibrosis in NAFLD. *Hepatology* 74, 5–8. <https://doi.org/10.1002/hep.31805>
- Tacke, F., Puengel, T., Loomba, R., Friedman, S.L., 2023. An integrated view of anti-inflammatory and antifibrotic targets for the treatment of NASH. *Journal of Hepatology* 79, 552–566. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.03.038>
- Tagkou, N.M., Goossens, N., 2023. Stéatose hépatique non alcoolique : diagnostic et traitement en 2022. *Schweizer Gastroenterologie* 4, 27–37. <https://doi.org/10.1007/s43472-023-00091-9>
- Taher, T.E.I., Smit, L., Griffioen, A.W., Schilder-Tol, E.J.M., Borst, J., Pals, S.T., 1996. Signaling through CD44 Is Mediated by Tyrosine Kinases: ASSOCIATION WITH p56lck IN T LYMPHOCYTES (*). *Journal of Biological Chemistry* 271, 2863–2867. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.5.2863>
- Takahashi, T., Suzuki, T., 2012. Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. *J Lipid Res* 53, 1437–1450. <https://doi.org/10.1194/jlr.R026682>
- Tang, L., Peng, H., Zhou, J., Chen, Y., Wei, H., Sun, R., Yokoyama, W.M., Tian, Z., 2016. Differential phenotypic and functional properties of liver-resident NK cells and mucosal ILC1s. *J Autoimmun* 67, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.09.004>
- Tan-Garcia, A., Lai, F., Sheng Yeong, J.P., Irac, S.E., Ng, P.Y., Msallam, R., Tatt Lim, J.C., Wai, L.-E., Tham, C.Y.L., Choo, S.P., Lim, T., Young, D.Y., D'Ambrosio, R., Degasperis, E., Perbellini, R., Newell, E., Le Bert, N., Ginhoux, F., Bertolotti, A., Chen, Q., Dutertre, C.-A., 2020. Liver fibrosis and CD206⁺ macrophage accumulation are suppressed by anti-GM-CSF therapy. *JHEP Rep* 2, 100062. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2019.11.006>

- Teder, P., Vandivier, R.W., Jiang, D., Liang, J., Cohn, L., Puré, E., Henson, P.M., Noble, P.W., 2002. Resolution of lung inflammation by CD44. *Science* 296, 155–158. <https://doi.org/10.1126/science.1069659>
- Terabe, M., Berzofsky, J.A., 2014. The immunoregulatory role of type I and type II NKT cells in cancer and other diseases. *Cancer Immunol Immunother* 63, 199–213. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1509-4>
- Theurich, S., Tsaousidou, E., Hanssen, R., Lempradl, A.M., Mauer, J., Timper, K., Schilbach, K., Folz-Donahue, K., Heilinger, C., Sexl, V., Pospisilik, J.A., Wunderlich, F.T., Brüning, J.C., 2017. IL-6/Stat3-Dependent Induction of a Distinct, Obesity-Associated NK Cell Subpopulation Deteriorates Energy and Glucose Homeostasis. *Cell Metabolism* 26, 171-184.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.018>
- Theurl, I., Hilgendorf, I., Nairz, M., Tymoszyk, P., Haschka, D., Asshoff, M., He, S., Gerhardt, L.M.S., Holderried, T.A.W., Seifert, M., Sopper, S., Fenn, A.M., Anzai, A., Rattik, S., McAlpine, C., Theurl, M., Wieghofer, P., Iwamoto, Y., Weber, G.F., Harder, N.K., Chousterman, B.G., Arvedson, T.L., McKee, M., Wang, F., Lutz, O.M.D., Rezoagli, E., Babitt, J.L., Berra, L., Prinz, M., Nahrendorf, M., Weiss, G., Weissleder, R., Lin, H.Y., Swirski, F.K., 2016. On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nat Med* 22, 945–951. <https://doi.org/10.1038/nm.4146>
- Tobin, L.M., Mavinkurve, M., Carolan, E., Kinlen, D., O'Brien, E.C., Little, M.A., Finlay, D.K., Cody, D., Hogan, A.E., O'Shea, D., n.d. NK cells in childhood obesity are activated, metabolically stressed, and functionally deficient. *JCI Insight* 2, e94939. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.94939>
- Tosello-Trampont, A., Surette, F.A., Ewald, S.E., Hahn, Y.S., 2017. Immunoregulatory Role of NK Cells in Tissue Inflammation and Regeneration. *Front Immunol* 8, 301. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00301>
- Tosello-Trampont, A.-C., Krueger, P., Narayanan, S., Landes, S.G., Leitinger, N., Hahn, Y.S., 2016. NKp46+ NK cells attenuate metabolism-induced hepatic fibrosis by regulating macrophage activation. *Hepatology* 63, 799–812. <https://doi.org/10.1002/hep.28389>
- Tosello-Trampont, A.-C., Landes, S.G., Nguyen, V., Novobrantseva, T.I., Hahn, Y.S., 2012. Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor- α production. *J Biol Chem* 287, 40161–40172. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.417014>
- Toubal, A., Nel, I., Lotersztajn, S., Lehuen, A., 2019. Mucosal-associated invariant T cells and disease. *Nat Rev Immunol* 19, 643–657. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0191-y>
- Trabanelli, S., Ercolano, G., Wyss, T., Gomez-Cadena, A., Falquet, M., Cropp, D., Imbratta, C., Leblond, M.M., Salvestrini, V., Curti, A., Adotevi, O., Jandus, C., Verdeil, G., 2022. c-Maf enforces cytokine production and promotes memory-like responses in mouse and human type 2 innate lymphoid cells. *EMBO J* 41, e109300. <https://doi.org/10.15252/embj.2021109300>
- Tran, A., Gual, P., 2013. Non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 37, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2012.07.005>
- Tran, S., Baba, I., Poupel, L., Dussaud, S., Moreau, M., Gélinau, A., Marcelin, G., Magréau-Davy, E., Ouhachi, M., Lesnik, P., Boissonnas, A., Le Goff, W., Clausen, B.E., Yvan-Charvet, L., Sennlaub, F., Huby, T., Gautier, E.L., 2020. Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis. *Immunity* 53, 627-640.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.003>
- Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., Affaticati, P., Gilfillan, S., Lantz, O., 2003. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 422, 164–169. <https://doi.org/10.1038/nature01433>
- Trittel, S., Vashist, N., Ebensen, T., Chambers, B.J., Guzmán, C.A., Riese, P., 2019. Invariant NKT Cell-Mediated Modulation of ILC1s as a Tool for Mucosal Immune Intervention. *Front Immunol* 10, 1849. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01849>
- Tsou, A.M., Yano, H., Parkhurst, C.N., Mahlaköiv, T., Chu, C., Zhang, W., He, Z., Jarick, K.J., Zhong, C., Putzel, G.G., Hatazaki, M., Lorenz, I.C., Andrew, D., Balderes, P., Klose, C.S.N., Lira, S.A., Artis, J.

- D., 2022. Neuropeptide regulation of non-redundant ILC2 responses at barrier surfaces. *Nature* 611, 787–793. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05297-6>
- Tsuneki, M., Madri, J.A., 2014. CD44 Regulation of Endothelial Cell Proliferation and Apoptosis via Modulation of CD31 and VE-cadherin Expression. *J Biol Chem* 289, 5357–5370. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.529313>
- Tsymala, I., Kuchler, K., 2023. Innate lymphoid cells—Underexplored guardians of immunity. *PLoS Pathog* 19, e1011678. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011678>
- Tu, T., Calabro, S.R., Lee, A., Maczurek, A.E., Budzinska, M.A., Warner, F.J., McLennan, S.V., Shackel, N.A., 2015. Hepatocytes in liver injury: Victim, bystander, or accomplice in progressive fibrosis? *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 30, 1696–1704. <https://doi.org/10.1111/jgh.13065>
- Ujii, H., Shevach, E.M., 2016. $\gamma\delta$ T cells protect the liver and lungs of mice from autoimmunity induced by scurfy lymphocytes. *J Immunol* 196, 1517–1528. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501774>
- Ussher, J.E., Bilton, M., Attwod, E., Shadwell, J., Richardson, R., de Lara, C., Mettke, E., Kurioka, A., Hansen, T.H., Klenerman, P., Willberg, C.B., 2014. CD161⁺⁺CD8⁺ T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *Eur J Immunol* 44, 195–203. <https://doi.org/10.1002/eji.201343509>
- Vachon, E., Martin, R., Plumb, J., Kwok, V., Vandivier, R.W., Glogauer, M., Kapus, A., Wang, X., Chow, C.-W., Grinstein, S., Downey, G.P., 2006. CD44 is a phagocytic receptor. *Blood* 107, 4149–4158. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3808>
- Valle-Noguera, A., Ochoa-Ramos, A., Gomez-Sánchez, M.J., Cruz-Adalia, A., 2021. Type 3 Innate Lymphoid Cells as Regulators of the Host-Pathogen Interaction. *Front Immunol* 12, 748851. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.748851>
- van de Pavert, S.A., 2021. Lymphoid Tissue inducer (LTi) cell ontogeny and functioning in embryo and adult. *Biomed J* 44, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.12.003>
- van der Windt, D.J., Sud, V., Zhang, H., Varley, P.R., Goswami, J., Yazdani, H.O., Tohme, S., Loughran, P., O’Doherty, R.M., Minervini, M.I., Huang, H., Simmons, R.L., Tsung, A., 2018. NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS PROMOTE INFLAMMATION AND DEVELOPMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS. *Hepatology* 68, 1347–1360. <https://doi.org/10.1002/hep.29914>
- Van Dyken, S.J., Nussbaum, J.C., Lee, J., Molofsky, A.B., Liang, H.-E., Pollack, J.L., Gate, R.E., Haliburton, G.E., Ye, C.J., Marson, A., Erle, D.J., Locksley, R.M., 2016. A tissue checkpoint regulates type 2 immunity. *Nat Immunol* 17, 1381–1387. <https://doi.org/10.1038/ni.3582>
- Van Maele, L., Carnoy, C., Cayet, D., Ivanov, S., Porte, R., Deruy, E., Chabalgoity, J.A., Renaud, J.-C., Eberl, G., Benecke, A.G., Trottein, F., Faveeuw, C., Sirard, J.-C., 2014. Activation of Type 3 Innate Lymphoid Cells and Interleukin 22 Secretion in the Lungs During *Streptococcus pneumoniae* Infection. *The Journal of Infectious Diseases* 210, 493–503. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu106>
- Vanamee, É.S., Faustman, D.L., 2018. Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling. *Science Signaling* 11, eaao4910. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aao4910>
- Vancamelbeke, M., Vermeire, S., 2017. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 821–834. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324, 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Vatner, D.F., Majumdar, S.K., Kumashiro, N., Petersen, M.C., Rahimi, Y., Gattu, A.K., Bears, M., Camporez, J.-P.G., Cline, G.W., Jurczak, M.J., Samuel, V.T., Shulman, G.I., 2015. Insulin-independent regulation of hepatic triglyceride synthesis by fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 1143–1148. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423952112>

- Verdam, F.J., Rensen, S.S., Driessen, A., Greve, J.W., Buurman, W.A., 2011. Novel evidence for chronic exposure to endotoxin in human nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 45, 149–152. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3181e12c24>
- Vernon, H., Wehrle, C.J., Alia, V.S.K., Kasi, A., 2024. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Liver, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Viel, S., Besson, L., Charrier, E., Marçais, A., Disse, E., Bienvenu, J., Walzer, T., Dumontet, C., 2017. Alteration of Natural Killer cell phenotype and function in obese individuals. *Clinical Immunology, Special Issue: NK Cells: From bench to bedside* 177, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.01.007>
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F., Spits, H., 2018. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* 174, 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>
- Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., Ugolini, S., 2011. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* 331, 44–49. <https://doi.org/10.1126/science.1198687>
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S., 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9, 503–510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>
- von Karstedt, S., Montinaro, A., Walczak, H., 2017. Exploring the TRAILS less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 17, 352–366. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.28>
- von Vietinghoff, S., Ley, K., 2008. Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J Immunol* 181, 5183–5188.
- Vonarbourg, C., Mortha, A., Bui, V.L., Hernandez, P.P., Kiss, E.A., Hoyler, T., Flach, M., Bengsch, B., Thimme, R., Hölscher, C., Hönig, M., Pannicke, U., Schwarz, K., Ware, C.F., Finke, D., Diefenbach, A., 2010. L'expression régulée du récepteur nucléaire ROR γ t confère des destins fonctionnels distincts aux lymphocytes innés exprimant le récepteur des cellules NK+. *Immunity* 33, 736–751. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.017>
- Voskoboinik, I., Thia, M.-C., Fletcher, J., Ciccone, A., Browne, K., Smyth, M.J., Trapani, J.A., 2005. Calcium-dependent Plasma Membrane Binding and Cell Lysis by Perforin Are Mediated through Its C2 Domain: A CRITICAL ROLE FOR ASPARTATE RESIDUES 429, 435, 483, AND 485 BUT NOT 491*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 8426–8434. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413303200>
- Vroegrijk, I.O.C.M., van Klinken, J.B., van Diepen, J.A., van den Berg, S.A.A., Febbraio, M., Steinbusch, L.K.M., Glatz, J.F.C., Havekes, L.M., Voshol, P.J., Rensen, P.C.N., van Dijk, K.W., van Harmelen, V., 2013. CD36 is important for adipocyte recruitment and affects lipolysis. *Obesity* 21, 2037–2045. <https://doi.org/10.1002/oby.20354>
- Wada, H., Miyoshi, J., Kuronuma, S., Nishinarita, Y., Oguri, N., Hibi, N., Takeuchi, O., Akimoto, Y., Lee, S.T.M., Matsuura, M., Kobayashi, T., Hibi, T., Hisamatsu, T., 2023. 5-Aminosalicylic acid alters the gut microbiota and altered microbiota transmitted vertically to offspring have protective effects against colitis. *Sci Rep* 13, 12241. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39491-x>
- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., Vivier, E., 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force.” *Blood* 106, 2252–2258. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1154>
- Wang, F., Zhang, X., Liu, W., Zhou, Y., Wei, W., Liu, D., Wong, C.C., Sung, J.J.Y., Yu, J., 2022. Activated Natural Killer Cell Promotes Nonalcoholic Steatohepatitis Through Mediating JAK/STAT Pathway. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 13, 257–274. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.08.019>
- Wang, J., Kubes, P., 2016. A Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair. *Cell* 165, 668–678. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.009>
- Wang, J.-L., Su, W.-Y., Lin, Y.-W., Xiong, H., Chen, Y.-X., Xu, J., Fang, J.-Y., 2016. CD44v6 overexpression related to metastasis and poor prognosis of colorectal cancer: A meta-analysis. *Oncotarget* 8, 12866–12876. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14163>
- Wang, T., Marquardt, C., Foker, J., 1976. Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* 261, 702–705. <https://doi.org/10.1038/261702a0>

- Wang, X., Ota, N., Manzanillo, P., Kates, L., Zavala-Solorio, J., Eidenschenk, C., Zhang, J., Lesch, J., Lee, W.P., Ross, J., Diehl, L., van Bruggen, N., Kolumam, G., Ouyang, W., 2014. Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature* 514, 237–241. <https://doi.org/10.1038/nature13564>
- Wang, X., Peng, H., Tian, Z., 2019. Innate lymphoid cell memory. *Cell Mol Immunol* 16, 423–429. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0212-6>
- Wang, Xiaoxiao, Rao, H., Liu, F., Wei, L., Li, H., Wu, C., 2021. Recent Advances in Adipose Tissue Dysfunction and Its Role in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Cells* 10, 3300. <https://doi.org/10.3390/cells10123300>
- Wang, Xiaolin, Seo, W., Park, S.H., Fu, Y., Hwang, S., Rodrigues, R.M., Feng, D., Gao, B., He, Y., 2021. MicroRNA-223 restricts liver fibrosis by inhibiting the TAZ-IHH-GLI2 and PDGF signaling pathways via the crosstalk of multiple liver cell types. *Int J Biol Sci* 17, 1153–1167. <https://doi.org/10.7150/ijbs.58365>
- Wang, X., Tian, Z., 2018. $\gamma\delta$ T cells in liver diseases. *Front. Med.* 12, 262–268. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0584-x>
- Wang, X.-K., Peng, Z.-G., 2021. Targeting Liver Sinusoidal Endothelial Cells: An Attractive Therapeutic Strategy to Control Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in Pharmacology* 12.
- Wang, Y., van der Tuin, S., Tjeerdema, N., van Dam, A.D., Rensen, S.S., Hendriks, T., Berbée, J.F.P., Atanasovska, B., Fu, J., Hoekstra, M., Bekkering, S., Riksen, N.P., Buurman, W.A., Greve, J.W., Hofker, M.H., Shiri-Sverdlov, R., Meijer, O.C., Smit, J.W.A., Havekes, L.M., van Dijk, K.W., Rensen, P.C.N., 2015. Plasma cholesteryl ester transfer protein is predominantly derived from Kupffer cells. *Hepatology* 62, 1710–1722. <https://doi.org/10.1002/hep.27985>
- Wang, Z., Guan, D., Wang, S., Chai, L.Y.A., Xu, S., Lam, K.-P., 2020. Glycolysis and Oxidative Phosphorylation Play Critical Roles in Natural Killer Cell Receptor-Mediated Natural Killer Cell Functions. *Front Immunol* 11, 202. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00202>
- Weber, G.F., Ashkar, S., Glimcher, M.J., Cantor, H., 1996. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271, 509–512. <https://doi.org/10.1126/science.271.5248.509>
- Wehr, A., Baeck, C., Heymann, F., Niemietz, P.M., Hammerich, L., Martin, C., Zimmermann, H.W., Pack, O., Gassler, N., Hittatiya, K., Ludwig, A., Luedde, T., Trautwein, C., Tacke, F., 2013. Chemokine Receptor CXCR6-Dependent Hepatic NK T Cell Accumulation Promotes Inflammation and Liver Fibrosis. *The Journal of Immunology* 190, 5226–5236. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202909>
- Wei, X., Wang, J.-P., Hao, C.-Q., Yang, X.-F., Wang, L.-X., Huang, C.-X., Bai, X.-F., Lian, J.-Q., Zhang, Y., 2016. Notch Signaling Contributes to Liver Inflammation by Regulation of Interleukin-22-Producing Cells in Hepatitis B Virus Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 6, 132. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00132>
- Weiskirchen, R., Tacke, F., 2014. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg Nutr* 3, 344–363. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.03>
- Weizman, O.-E., Song, E., Adams, N.M., Hildreth, A.D., Riggan, L., Krishna, C., Aguilar, O.A., Leslie, C.S., Carlyle, J.R., Sun, J.C., O’Sullivan, T.E., 2019. Mouse cytomegalovirus-experienced ILC1s acquire a memory response dependent on the viral glycoprotein m12. *Nat Immunol* 20, 1004–1011. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0430-1>
- Wen, Y., Lambrecht, J., Ju, C., Tacke, F., 2021. Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases—diversity, plasticity and therapeutic opportunities. *Cell Mol Immunol* 18, 45–56. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00558-8>
- Weng, X., Jiang, H., Zhou, H., Lin, D., Wang, J., Kang, L., 2023. Deletion of CD44 promotes adipogenesis by regulating PPAR γ and cell cycle-related pathways. <https://doi.org/10.1101/2023.10.13.562173>
- Wensveen, F.M., Jelenčić, V., Valentić, S., Šestan, M., Wensveen, T.T., Theurich, S., Glasner, A., Mendrila, D., Štimac, D., Wunderlich, F.T., Brüning, J.C., Mandelboim, O., Polić, B., 2015. NK cells link

- obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat Immunol* 16, 376–385. <https://doi.org/10.1038/ni.3120>
- Wilhelm, C., Harrison, O.J., Schmitt, V., Pelletier, M., Spencer, S.P., Urban, J.F., Ploch, M., Ramalingam, T.R., Siegel, R.M., Belkaid, Y., 2016. Critical role of fatty acid metabolism in ILC2-mediated barrier protection during malnutrition and helminth infection. *J Exp Med* 213, 1409–1418. <https://doi.org/10.1084/jem.20151448>
- Wilkinson, A.L., Qurashi, M., Shetty, S., 2020. The Role of Sinusoidal Endothelial Cells in the Axis of Inflammation and Cancer Within the Liver. *Front Physiol* 11, 990. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00990>
- Wolf, M.J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Egger, M., Wohlleber, D., Lorentzen, A., Einer, C., Schulz, S., Clavel, T., Protzer, U., Thiele, C., Zischka, H., Moch, H., Tschöp, M., Tumanov, A.V., Haller, D., Unger, K., Karin, M., Kopf, M., Knolle, P., Weber, A., Heikenwalder, M., 2014. Metabolic Activation of Intrahepatic CD8+ T Cells and NKT Cells Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Cancer via Cross-Talk with Hepatocytes. *Cancer Cell* 26, 549–564. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.003>
- Wong, N.K.Y., Lai, J.C.Y., Maeshima, N., Johnson, P., 2011. CD44-mediated elongated T cell spreading requires Pyk2 activation by Src family kinases, extracellular calcium, phospholipase C and phosphatidylinositol-3 kinase. *Cellular Signalling* 23, 812–819. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.01.003>
- Wong, V.W.-S., Wong, G.L.-H., Tsang, S.W.-C., Hui, A.Y., Chan, A.W.-H., Choi, P.C.-L., Chim, A.M.-L., Chu, S., Chan, F.K.-L., Sung, J.J.-Y., Chan, H.L.-Y., 2009. Metabolic and histological features of non-alcoholic fatty liver disease patients with different serum alanine aminotransferase levels. *Aliment Pharmacol Ther* 29, 387–396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2008.03896.x>
- Wree, A., Holtmann, T.M., Inzaugarat, M.E., Feldstein, A.E., 2019. Novel Drivers of the Inflammatory Response in Liver Injury and Fibrosis. *Semin Liver Dis* 39, 275–282. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1685515>
- Wu, C., Xue, Y., Wang, P., Lin, L., Liu, Q., Li, N., Xu, J., Cao, X., 2014. IFN- γ primes macrophage activation by increasing phosphatase and tensin homolog via downregulation of miR-3473b. *J Immunol* 193, 3036–3044. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302379>
- Wu, L., Parekh, V.V., Gabriel, C.L., Bracy, D.P., Marks-Shulman, P.A., Tamboli, R.A., Kim, S., Mendez-Fernandez, Y.V., Besra, G.S., Lomenick, J.P., Williams, B., Wasserman, D.H., Van Kaer, L., 2012. Activation of invariant natural killer T cells by lipid excess promotes tissue inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E1143–E1152. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200498109>
- Wu, Y., Kuang, D.-M., Pan, W.-D., Wan, Y.-L., Lao, X.-M., Wang, D., Li, X.-F., Zheng, L., 2013. Monocyte/macrophage-elicited natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma is mediated by CD48/2B4 interactions. *Hepatology* 57, 1107–1116. <https://doi.org/10.1002/hep.26192>
- Wu, Z., Xu, J., Tan, J., Song, Y., Liu, L., Zhang, F., Zhang, Y., Li, X., Chi, Y., Liu, Y., 2019. Mesenteric adipose tissue B lymphocytes promote local and hepatic inflammation in non-alcoholic fatty liver disease mice. *J Cell Mol Med* 23, 3375–3385. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14232>
- Xia, C., Razavi, M., Rao, X., Braunstein, Z., Mao, H., Toomey, A.C., Wang, Y., Simon, D.I., Zhao, S., Rajagopalan, S., Zhong, J., 2019. MRP14 enhances the ability of macrophage to recruit T cells and promotes obesity-induced insulin resistance. *Int J Obes* 43, 2434–2447. <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0366-4>
- Xie, P., Yan, J., Wu, M., Li, H., Chen, Z., Yu, M., Zhang, B., Chen, L., Jin, L., Zhou, B., Li, X., Xiao, Y., Xu, Y., Long, J., Zhang, J., Guo, L., 2022. CD44 potentiates hepatocellular carcinoma migration and extrahepatic metastases via the AKT/ERK signaling CXCR4 axis. *Ann Transl Med* 10, 689. <https://doi.org/10.21037/atm-22-2482>
- Xie, X., Yan, D., Li, H., Zhu, Q., Li, J., Fang, Y., Cheung, C.W., Irwin, M.G., Xia, Z., Lian, Q., 2018. Enhancement of Adiponectin Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease via Inhibition of

- FoxO1 in Type I Diabetic Rats. *J Diabetes Res* 2018, 6254340. <https://doi.org/10.1155/2018/6254340>
- Xin, D., Zong-Shun, L., Bang-Mao, W., Lu, Z., 2014. Expression of intestinal tight junction proteins in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatogastroenterology* 61, 136–140.
- Xiong, X., Kuang, H., Ansari, S., Liu, T., Gong, J., Wang, S., Zhao, X.-Y., Ji, Y., Li, C., Guo, L., Zhou, L., Chen, Z., Leon-Mimila, P., Chung, M.T., Kurabayashi, K., Opp, J., Campos-Pérez, F., Villamil-Ramírez, H., Canizales-Quinteros, S., Lyons, R., Lumeng, C.N., Zhou, B., Qi, L., Huertas-Vazquez, A., Lusic, A.J., Xu, X.Z.S., Li, S., Yu, Y., Li, J.Z., Lin, J.D., 2019. Landscape of intercellular crosstalk in healthy and NASH liver revealed by single-cell secretome gene analysis. *Mol Cell* 75, 644-660.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.028>
- Xu, W., Cherrier, D.E., Chea, S., Vosshenrich, C., Serafini, N., Petit, M., Liu, P., Golub, R., Di Santo, J.P., 2019. An Id2RFP-Reporter Mouse Redefines Innate Lymphoid Cell Precursor Potentials. *Immunity* 50, 1054-1068.e3. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.02.022>
- Yang, C., Lin, J., Liang, H., Xue, L., Kwart, A., Jiang, M., Zhao, J., Ren, H., Jiang, X., Munshi, N.C., 2022. CD44 v5 domain inhibition represses the polarization of Th2 cells by interfering with the IL-4/IL-4R signaling pathway. *Immunol Cell Biol* 100, 21–32. <https://doi.org/10.1111/imcb.12491>
- Yang, C., Tsaih, S.-W., Lemke, A., Flister, M.J., Thakar, M.S., Malarkannan, S., n.d. mTORC1 and mTORC2 differentially promote natural killer cell development. *eLife* 7, e35619. <https://doi.org/10.7554/eLife.35619>
- Yang, L., Zhang, Y., Wang, L., Fan, F., Zhu, L., Li, Z., Ruan, X., Huang, H., Wang, Z., Huang, Z., Huang, Y., Yan, X., Chen, Y., 2010. Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22. *Journal of Hepatology* 53, 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.03.004>
- Yang, Q., Li, F., Harly, C., Xing, S., Ye, L., Xia, X., Wang, H., Wang, X., Yu, S., Zhou, X., Cam, M., Xue, H.-H., Bhandoola, A., 2015. TCF-1 upregulation identifies early innate lymphoid progenitors in the bone marrow. *Nat Immunol* 16, 1044–1050. <https://doi.org/10.1038/ni.3248>
- Yang Zhou, J., 2023. Innate immunity and early liver inflammation. *Frontiers in Immunology* 14.
- Yao, J., Zhou, C.-S., Ma, X., Fu, B.-Q., Tao, L.-S., Chen, M., Xu, Y.-P., 2014. FXR agonist GW4064 alleviates endotoxin-induced hepatic inflammation by repressing macrophage activation. *World J Gastroenterol* 20, 14430–14441. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i39.14430>
- Ye, D., Zhang, T., Lou, G., Liu, Y., 2018. Role of miR-223 in the pathophysiology of liver diseases. *Exp Mol Med* 50, 128. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0153-7>
- Yoneda, M., Kobayashi, T., Asako, N., Iwaki, M., Saito, S., Nakajima, A., 2022. Pan-peroxisome proliferator-activated receptor agonist lanifibranor as a dominant candidate pharmacological therapy for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg Nutr* 11, 433–435. <https://doi.org/10.21037/hbsn-21-579>
- Yoshiji, H., Kuriyama, S., Miyamoto, Y., Thorgeirsson, U.P., Gomez, D.E., Kawata, M., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Thorgeirsson, S.S., Fukui, H., 2000. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology* 32, 1248–1254. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.20521>
- You, Z., Chi, H., 2023. Lipid metabolism in dendritic cell biology. *Immunological Reviews* 317, 137–151. <https://doi.org/10.1111/imr.13215>
- Youle, R.J., 2019. Mitochondria—Striking a balance between host and endosymbiont. *Science* 365, eaaw9855. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9855>
- Younossi, Z.M., Ratziu, V., Loomba, R., Rinella, M., Anstee, Q.M., Goodman, Z., Bedossa, P., Geier, A., Beckebaum, S., Newsome, P.N., Sheridan, D., Sheikh, M.Y., Trotter, J., Knapp, W., Lawitz, E., Abdelmalek, M.F., Kowdley, K.V., Montano-Loza, A.J., Boursier, J., Mathurin, P., Bugianesi, E., Mazzella, G., Oliveira, A., Cortez-Pinto, H., Graupera, I., Orr, D., Gluud, L.L., Dufour, J.-F., Shapiro, D., Campagna, J., Zaru, L., MacConell, L., Shringarpure, R., Harrison, S., Sanyal, A.J., REGENERATE Study Investigators, 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. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33041-7)

- Yu, S.S., Cirillo, N., 2020. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *Journal of Cellular Physiology* 235, 65–73. <https://doi.org/10.1002/jcp.28963>
- Yu, W., He, J., Wang, F., He, Q., Shi, Y., Tao, X., Sun, B., 2023. NR4A1 mediates NK-cell dysfunction in hepatocellular carcinoma via the IFN- γ /p-STAT1/IRF1 pathway. *Immunology* 169, 69–82. <https://doi.org/10.1111/imm.13611>
- Yu, X., Lan, P., Hou, X., Han, Q., Lu, N., Li, T., Jiao, C., Zhang, J., Zhang, C., Tian, Z., 2017. HBV inhibits LPS-induced NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β production via suppressing the NF- κ B pathway and ROS production. *Journal of Hepatology* 66, 693–702. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.12.018>
- Yu, X., Wang, Y., Deng, M., Li, Y., Ruhn, K.A., Zhang, C.C., Hooper, L.V., n.d. The basic leucine zipper transcription factor NFIL3 directs the development of a common innate lymphoid cell precursor. *eLife* 3, e04406. <https://doi.org/10.7554/eLife.04406>
- Yuan, X., Berg, N., Woong Lee, J., Le, T.-T., Neudecker, V., Jing, N., Eltzschig, H., 2018. MicroRNA miR-223 as Regulator of Innate Immunity. *J Leukoc Biol* 104, 515–524. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0218-079R>
- Yudanin, N.A., Schmitz, F., Flamar, A.-L., Thome, J.J.C., Tait-Wojno, E., Moeller, J.B., Schirmer, M., Latorre, I.J., Xavier, R., Farber, D.L., Monticelli, L.A., Artis, D., 2019. Spatial and temporal mapping of human innate lymphoid cells reveals elements of tissue specificity. *Immunity* 50, 505–519.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.012>
- Yue, B., Yu, Z.-L., Lv, C., Geng, X.-L., Wang, Z.-T., Dou, W., 2020. Regulation of the intestinal microbiota: An emerging therapeutic strategy for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 26, 4378–4393. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i30.4378>
- Zannetti, C., Roblot, G., Charrier, E., Ainouze, M., Tout, I., Briat, F., Isorce, N., Faure-Dupuy, S., Michelet, M., Marotel, M., Kati, S., Schulz, T.F., Rivoire, M., Traverse-Glehen, A., Luangsay, S., Alatif, O., Henry, T., Walzer, T., Durantel, D., Hasan, U., 2016. Characterization of the Inflammasome in Human Kupffer Cells in Response to Synthetic Agonists and Pathogens. *The Journal of Immunology* 197, 356–367. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502301>
- Zeng, Z., Surewaard, B.G.J., Wong, C.H.Y., Geoghegan, J.A., Jenne, C.N., Kubes, P., 2016. CR1g Functions as a Macrophage Pattern Recognition Receptor to Directly Bind and Capture Blood-Borne Gram-Positive Bacteria. *Cell Host & Microbe* 20, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.06.002>
- Zhang, F., Jiang, W.W., Li, X., Qiu, X.Y., Wu, Z., Chi, Y.J., Cong, X., Liu, Y.L., 2016. Role of intrahepatic B cells in non-alcoholic fatty liver disease by secreting pro-inflammatory cytokines and regulating intrahepatic T cells. *Journal of Digestive Diseases* 17, 464–474. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12362>
- Zhang, J., He, X., Wan, Y., Zhang, H., Tang, T., Zhang, M., Yu, S., Zhao, W., Chen, L., 2021. CD44 promotes hepatocellular carcinoma progression via upregulation of YAP. *Experimental Hematology & Oncology* 10, 54. <https://doi.org/10.1186/s40164-021-00247-w>
- Zhang, J., Marotel, M., Fauteux-Daniel, S., Mathieu, A.-L., Viel, S., Marçais, A., Walzer, T., 2018. T-bet and Eomes govern differentiation and function of mouse and human NK cells and ILC1. *European Journal of Immunology* 48, 738–750. <https://doi.org/10.1002/eji.201747299>
- Zhang, Q., Liu, Jing, Liu, Jia, Huang, W., Tian, L., Quan, J., Wang, Y., Niu, R., 2014. oxLDL induces injury and defenestration of human liver sinusoidal endothelial cells via LOX1. *Journal of Molecular Endocrinology* 53, 281–293. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0049>
- Zhao, T., Li, H., Liu, Z., 2017. Tumor necrosis factor receptor 2 promotes growth of colorectal cancer via the PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol Lett* 13, 342–346. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5403>
- Zheng, M., Tian, Z., 2019. Liver-Mediated Adaptive Immune Tolerance. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02525>
- Zhong, C., Zhu, J., 2017. Transcriptional regulators dictate innate lymphoid cell fates. *Protein Cell* 8, 242–254. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0369-7>

- Zhong, F., Zhou, X., Xu, J., Gao, L., 2019. Rodent Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Digestion* 101, 522–535. <https://doi.org/10.1159/000501851>
- Zhou, L., Lin, Q., Sonnenberg, G.F., 2022. Metabolic control of innate lymphoid cells in health and disease. *Nat Metab* 4, 1650–1659. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00685-8>
- Zhou, W.-C., Zhang, Q.-B., Qiao, L., 2014. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology* 20, 7312–7324. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7312>
- Zhou, Y., Zhang, H., Yao, Y., Zhang, X., Guan, Y., Zheng, F., 2022. CD4+ T cell activation and inflammation in NASH-related fibrosis. *Front. Immunol.* 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.967410>
- Zhou, Z., Xu, M.-J., Gao, B., 2016. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cell Mol Immunol* 13, 301–315. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.97>
- Zhu, B., Suzuki, K., Goldberg, H.A., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., McCulloch, C.A.G., Sodek, J., 2004. Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-protein-coupled receptors: Evidence of a role for an intracellular form of osteopontin. *Journal of Cellular Physiology* 198, 155–167. <https://doi.org/10.1002/jcp.10394>
- Zindl, C.L., Witte, S.J., Laufer, V.A., Gao, M., Yue, Z., Janowski, K.M., Cai, B., Frey, B.F., Silberger, D.J., Harbour, S.N., Singer, J.R., Turner, H., Lund, F.E., Vallance, B.A., Rosenberg, A.F., Schoeb, T.R., Chen, J.Y., Hatton, R.D., Weaver, C.T., 2022. A Non-redundant Role for T cell-derived Interleukin 22 in Antibacterial Defense of Colonic Crypts. *Immunity* 55, 494-511.e11. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.02.003>

ANNEXES

Présentations orales et Posters

EMBO Workshop – Tissue-resident immune cells in health and disease – Marseille Mars 2024.
Communication Orale + Présentation poster “Contribution of CD44 in NKp46⁺ Innate Lymphoid Cells (ILC) in the development of metabolic steatohepatitis.”

Séminaire Doc/Post-Doc - Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire – Nice Mars 2022.
“Deciphering the regulation of metabolic pathways in hepatic NK cells”

Société Française d’immunologie – Cité de la Science et de l’Industrie – Paris Décembre 2020.
Présentation poster : “CD44 contributes to the interplay between NK cells, ILC1 and macrophages during metabolic-associated steatohepatitis.”



Chronic Inflammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies

Carmelo Luci¹, Manon Bourinet¹, Pierre S. Leclère¹, Rodolphe Anty² and Philippe Gual^{1*}

¹ Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France, ² Université Côte d'Azur, CHU, INSERM, C3M, Nice, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Magdalene K. Montgomery,
The University of Melbourne, Australia

Reviewed by:

Mohamed Elbadawy,
Benha University, Egypt
Rita De Vito,
Bambino Gesù Children Hospital
(IRCCS), Italy

*Correspondence:

Philippe Gual
philippe.gual@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Obesity,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 21 August 2020

Accepted: 03 November 2020

Published: 14 December 2020

Citation:

Luci C, Bourinet M, Leclère PS,
Anty R and Gual P (2020)
Chronic Inflammation in
Non-Alcoholic Steatohepatitis:
Molecular Mechanisms and
Therapeutic Strategies.
Front. Endocrinol. 11:597648.
doi: 10.3389/fendo.2020.597648

Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) is the progressive form of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), the main cause of chronic liver complications. The development of NASH is the consequence of aberrant activation of hepatic conventional immune, parenchymal, and endothelial cells in response to inflammatory mediators from the liver, adipose tissue, and gut. Hepatocytes, Kupffer cells and liver sinusoidal endothelial cells contribute to the significant accumulation of bone-marrow derived-macrophages and neutrophils in the liver, a hallmark of NASH. The aberrant activation of these immune cells elicits harmful inflammation and liver injury, leading to NASH progression. In this review, we highlight the processes triggering the recruitment and/or activation of hepatic innate immune cells, with a focus on macrophages, neutrophils, and innate lymphoid cells as well as the contribution of hepatocytes and endothelial cells in driving liver inflammation/fibrosis. On-going studies and preliminary results from global and specific therapeutic strategies to manage this NASH-related inflammation will also be discussed.

Keywords: NAFLD, NASH, inflammation, liver injury, macrophages, ILCs, hepatocytes, therapy

INTRODUCTION

Non Alcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLDs), recently renamed Metabolic Associated Fatty Liver Diseases (MAFLDs) to better reflect the pathogenesis (1, 2), are the most common chronic liver diseases, with a worldwide prevalence of 25% (3, 4). NAFLDs covers the full spectrum of fatty liver disease from hepatic steatosis to Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH), fibrosis/cirrhosis and hepatocellular cancer. The overall prevalence of NAFLD is growing in parallel with the global epidemic of obesity (5). Weight gain, insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and hypertension are risk factors for NAFLD progression (6, 7). Reciprocally, NAFLD is a risk factor for many metabolic diseases, including cardiovascular disease (8) and type 2 diabetes (9). NAFLD occurrence appears to be higher in men (10, 11), while postmenopausal women display an increased risk of severe fibrosis compared to men, which can probably be attributed to the loss of the protective effects of estrogen against fibrogenesis (11). Age also impacts the NAFLD prevalence and liver disease stage (12). NASH, which is considered to be the progressive form of the hepatic disease, is the second principal indication for hepatic

transplantation and the growing etiology for hepatocellular carcinoma (HCC) in patients being listed for the liver transplantation (16.2% of all liver transplantations) in USA (13, 14). Finally, specific pharmacological therapies are not yet approved for advanced NASH (Figure 1).

In addition to genetic and environmental factors, the interactions of the gut and adipose tissue with the liver enhance liver metabolic disorder (steatosis and insulin resistance), chronic inflammation and injury-mediated fibrosis (15). Adipose tissue plays an important role in the development of insulin resistance and NAFLDs. Trunk fat was found to be indicative of elevated ALT supporting the potential involvement of the metabolically active intra-abdominal fat in increased liver injury (16). Obesity is associated with an increase in adipose tissue lipolysis, and secretion of inflammatory and fibrotic mediators which can reach the liver. The accumulation of inflammatory/immune cells and the modification of the activities of these cells in the adipose tissue contributed to chronic low grade inflammation during obesity (17–24). This sustained inflammation mediates insulin-resistance and provides a contributing link between its development and NAFLD (25). The gut-liver axis is also a critical actor in the development of NAFLD. Gut dysbiosis is associated with the modulation of local immune systems and altered mucosal barrier integrity which, in turn, promotes the translocation of bacterial products (26). In concert with the local action, gut metabolites (decreased choline availability, increased trimethylamine, ethanol production,

changes in short-chain fatty acids, secondary bile acids, and branched-chain ramified amino acids, etc.) and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) modulate the metabolic and immune responses within many organs including adipose tissue, muscle and liver (27, 28). In addition to endotoxemia (circulating LPS), changes in microbiota in blood are associated with hepatic fibrosis in obese patients and liver tissue contains substantial amounts of bacterial DNA correlating with the histological disease severity in NAFLD subjects (29, 30).

In liver with NAFLD, a large amount of innate and adaptive immune cells including resident and recruited monocytes, macrophages, neutrophils and ILCs but also parenchymal hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) are involved in the onset of chronic inflammation (24, 31–36). The hepatocytes, LSECs, resident macrophages (Kupffer cells) are able to sense excessive levels of metabolites, damage-associated molecular patterns (DAMPs), and PAMPs and in turn elicit inflammatory events associated with metabolic dysfunction (31, 36). Recruited monocyte-derived macrophages and neutrophils are also key players in the NAFLD onset and progression, and new roles for ILC subsets have recently been described for NAFLD/obesity (24, 31–33). The immunological functions of several conventional immune cells and liver cells (hepatocytes, LSECs) in the context of obesity and NAFLD will be described in this review, which will also provide insights into the potential approaches to target these responses as therapies against NASH.

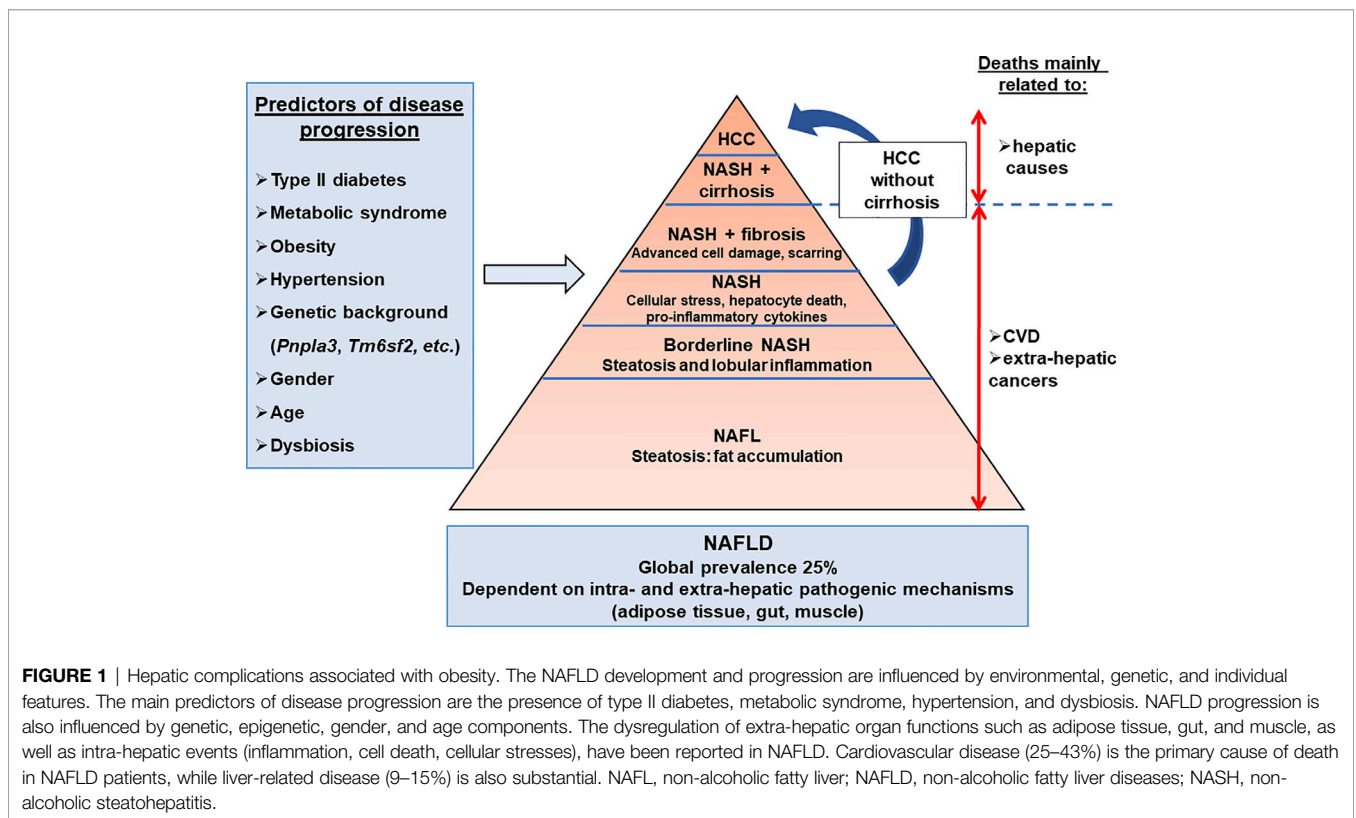


FIGURE 1 | Hepatic complications associated with obesity. The NAFLD development and progression are influenced by environmental, genetic, and individual features. The main predictors of disease progression are the presence of type II diabetes, metabolic syndrome, hypertension, and dysbiosis. NAFLD progression is also influenced by genetic, epigenetic, gender, and age components. The dysregulation of extra-hepatic organ functions such as adipose tissue, gut, and muscle, as well as intra-hepatic events (inflammation, cell death, cellular stresses), have been reported in NAFLD. Cardiovascular disease (25–43%) is the primary cause of death in NAFLD patients, while liver-related disease (9–15%) is also substantial. NAFL, non-alcoholic fatty liver; NAFLD, non-alcoholic fatty liver diseases; NASH, non-alcoholic steatohepatitis.

LIVER CELLS THAT PROMOTE THE IMMUNOLOGICAL RESPONSES ASSOCIATED WITH NASH

The main hepatic blood supply come from the gut via the portal vein (~80%). This blood supply is rich in toxins, food antigens and bacterial products from the environment. The hepatocytes, the most abundant liver cells (~70%), achieve the detoxifying and metabolic needs of the body. The remaining liver cells comprise the non-parenchymal cells (NPC), counting liver stellate cells (HSCs), sinusoidal endothelial cells (LSECs), and a variety of immune cells. The most abundant immune cells in the liver are resident macrophages, referred to as Kupffer cells (~20% among NPC). The liver also contains mucosal-associated invariant T (MAIT) cells, T cells, dendritic cells, natural killer cells (NK), neutrophils, iNKT, and ILCs. The inter-species variations in liver-resident immune cell populations need to be noted and taken into account for translational studies. For example, MAIT cells are one of the major liver populations of T cells in human (20–50% in human liver versus 0.4–0.6% in mouse liver) (37) and mouse liver contains less NK cells than human liver (5–10 versus 25–40% of total intrahepatic lymphocytes) (34). In addition to its detoxifying and metabolic roles, the liver is also a key immunological organ in the response to exogenous antigens, metabolites and pattern molecules (31, 38, 39). In the case of obesity, the liver sentinel cells such as monocyte-derived macrophages and resident Kupffer cells rapidly sense the local and persistent increase in pattern molecules, metabolites, and exogenous antigens. The liver then “transits” from an immune-tolerant state to an immune-active phenotype,

with a shift in production of anti-inflammatory cytokines such as transforming growth factor-β (TGF β) and interleukin-10 (IL10) and to pro-inflammatory cytokines such as IL1, IL6, and tumor necrosis factor (TNF-α). In turn, the interplay between innate and adaptive immune cells and hepatocytes drives the chronic low grade inflammation in NASH liver (31). Without underestimating the important role played by the adaptive immune system [reviewed in (34, 35)], the immunological functions of hepatocytes and sentinel cells including LSECs, macrophages, ILCs, and neutrophils according to liver steatosis development and its progression to fibrotic-NASH, which will be debated in the following section (Figure 2, Table 1).

Hepatocytes Have an Important Role in Local Inflammation

The mechanisms involved in the steatosis-NASH transition are multifactorial and not completely elucidated. In hepatocytes, the accumulation of triglycerides in lipid droplets is a protective mechanism and prevents lipotoxicity by buffering the toxic free fatty acids (47). However, it is always a question of equilibrium and this protective mechanism can be overwhelmed. To illustrate that, the inhibition of the triglyceride synthesis through the targeting of diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) improves liver steatosis but exacerbates the liver injury and fibrosis in obese mice with steatohepatitis (48). In contrast, appropriate regulation of DGAT2 activity has been shown to have a protective effect against NASH (49). Altered lipid droplet remodeling or lipid mobilization can enhance hepatocyte lipotoxicity and drive NAFLD progression. In line with this, genetic variants in transmembrane 6 superfamily

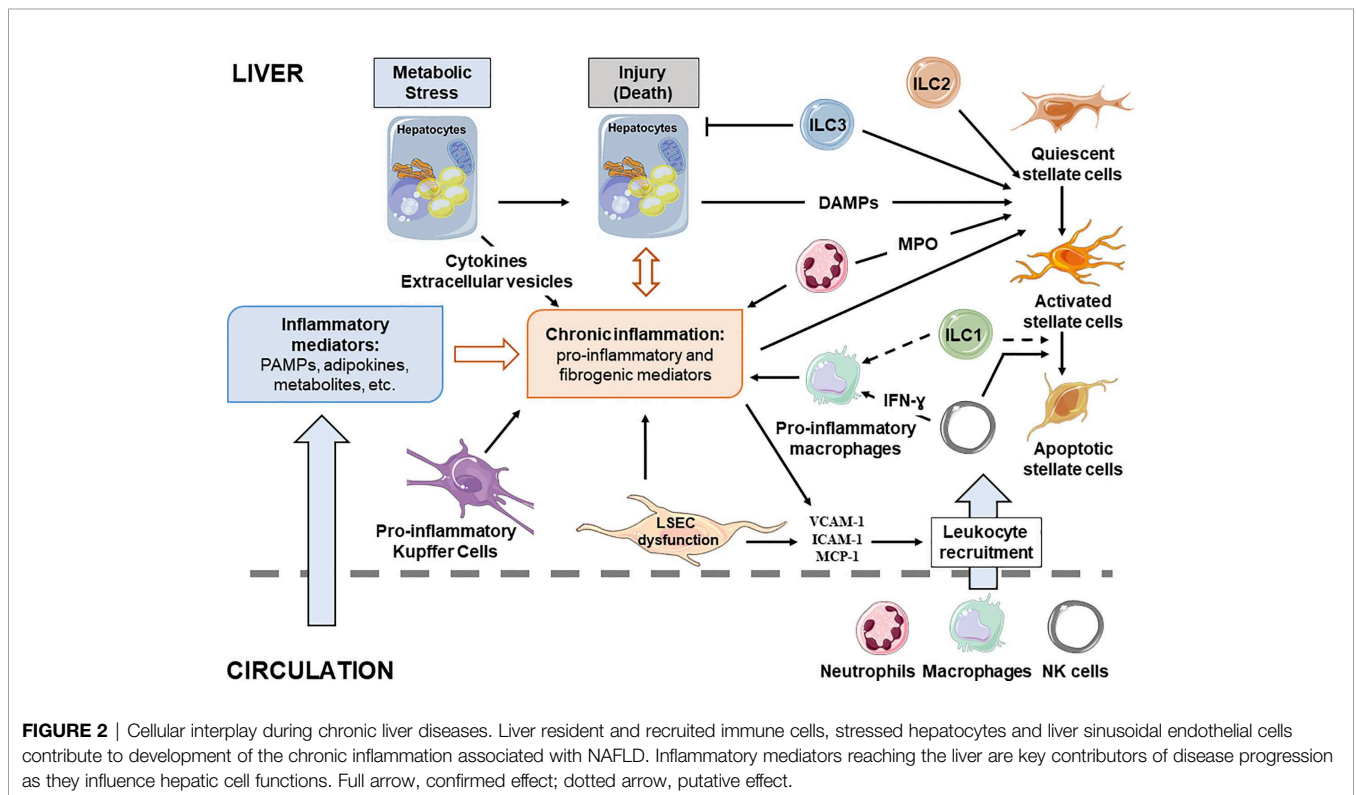


FIGURE 2 | Cellular interplay during chronic liver diseases. Liver resident and recruited immune cells, stressed hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells contribute to development of the chronic inflammation associated with NAFLD. Inflammatory mediators reaching the liver are key contributors of disease progression as they influence hepatic cell functions. Full arrow, confirmed effect; dotted arrow, putative effect.

TABLE 1 | Contribution of specific liver cells in the development of inflammation associated with NASH.

Type of cell	Roles in steatohepatitis	References
Hepatocytes	<ul style="list-style-type: none"> - sense PAMPs DAMPs, metabolite molecules (saturated FFA), and release inflammatory mediators (TNFα, IL1β) - hepatocyte death (lytic cell death > apoptosis) contribute to DAMPs induced inflammation - hepatocyte extracellular vesicles signals to immune cells 	(31, 40, 41)
LSECs	<ul style="list-style-type: none"> - orchestrate release of proinflammatory mediators (cytokines chemokines such as MCP1, IL1/6, TNFα), (adhesion molecules such as VCAM1, ICAM) - enhance liver inflammation, injury, and fibrosis 	(36, 42)
Resident and recruited macrophages	<ul style="list-style-type: none"> - sense PAMPs DAMPs and metabolites (saturated FFA), - contribute to the recruitment and activation of other hepatic immune cells via inflammatory chemokines and cytokines - specific subsets of liver macrophages enhance NAFLD progression 	(32, 43)
NK cells/ILC1	<ul style="list-style-type: none"> - production of IFNγ and TNFα - regulate macrophage polarization towards a pro-inflammatory phenotype - display an anti-fibrogenic role 	(24, 43, 44)
Neutrophils	<ul style="list-style-type: none"> - secretion of elastase, NETS - contribute to the onset of the early stage of NAFLD - promote hepatocyte injury 	(45, 46)

member 2 (TM6SF2) and patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) genes, resulting in loss-of-function and decreased VLDL secretion and lipid droplet remodeling, respectively, were robustly linked to NAFLD development and its progression (50, 51). Furthermore, proteins involved in hepatic lipid homeostasis can be differentially expressed and mediate *de novo* NAFLD progression. For example, members of the CIDE family, which can regulate lipid droplet synthesis, hepatic lipid homeostasis and cell death, are differentially regulated according to NAFLD development and severity in mouse and human studies. The gradual increase in FSP27 β /CIDEC2 expression with hepatic steatosis and then steatohepatitis could reflect the transition from the synthesis of protective lipid droplets to detrimental hepatocyte death. Indeed, the strong increase in FSP27 β expression in NASH liver is more narrowly related to liver injury and its over-expression sensitized hepatocytes to cell death induced by TNF α and palmitic acid (52). The vulnerable fatty and stressed hepatocytes then release danger signals such as DAMPs, alarmins and apoptotic bodies. This activation of “sterile” inflammation contributes to the initiation of a vicious cycle, where inflammation enhances the death of hepatocyte and *vice versa*.

Different types of hepatocyte death have been associated with NASH-driven hepatic inflammation and NAFLD progression such as apoptosis, necrosis, necroptosis, pyroptosis, and ferroptosis (40, 41). Apoptotic hepatocytes can directly initiate inflammation such as the activation macrophage after engulfment of apoptotic bodies. Furthermore, hepatocyte apoptosis frequency and the levels of a circulating surrogate biomarker of hepatocyte apoptosis (caspase-generated keratine-18 fragments) increased with NASH and fibrosis (53, 54). Lytic forms of hepatocellular death, including necrosis, pyroptosis, necroptosis, and ferroptosis also cause strong inflammatory responses through the cellular components release such as DAMPs. These cellular components contribute to the recruitment and activation of inflammatory cells and hepatic stellate cells (41). In addition, the release of pro-inflammatory vesicles by stressed cells may also promote angiogenesis and activation of hepatic stellate cells. The release of a C-X-C motif chemokine ligand-10 (CXCL-10) and ceramide-enriched

extracellular vesicles regulate liver trafficking and infiltration of monocytes and macrophages. Moreover, mitochondrial DNA and tumor necrosis factor-like apoptosis inducing ligand (TRAIL)-enriched extracellular vesicles promote macrophage activation (41). In addition, the senescence of hepatocytes is strongly correlated with the fibrosis stage, type 2 diabetes and the clinical outcome (55). While hepatocyte senescence, mainly caused by HFD and aging, has a detrimental impact on hepatic steatosis (56), the senescent HSCs produce less extracellular matrix components and more matrix metalloproteinases, thereby alleviating fibrosis advancement (57). More studies are thus required in order to clarify the role of senescence in the different liver cells impacting the NAFLD progression.

Hepatocytes also sense pathogens and metabolic molecules via their membrane and cytoplasmic pattern recognition receptors (PRRs) [Toll-like receptor -2, -4, -5, and -9 (TLR); nucleotide-binding oligomerization domain -1 and -2 (NOD), cGMP-AMP synthase, etc.] (31). They are strongly involved in the regulation of the cell-autonomous innate immune responses leading to increased local inflammation and the development of liver complications (steatosis, insulin resistance and injury). Deficiency of TLR-2, TLR-4, or TLR-9 in hepatocytes resolved hepatic inflammation mediated by diet associated with decreased insulin resistance, oxidative stress and hepatic steatosis (58, 59). In contrast, the deficiency of TLR5 in hepatocytes (~90% of its hepatic expression) strongly impaired bacterial clearance (bacterial flagellin) by the liver and aggravated NAFLD development (from steatosis to liver injury and fibrosis) upon HFD or MCDD challenge (60). In addition to hepatocytes, other “non-conventional immune cells” such as LSECs are key actors in NAFLD development and hepatic inflammation.

The Dysfunction of Sentinel LSECs Is Associated With NAFLD Progression From Hepatic Steatosis to Fibrosis

In physiological conditions, LSECs are gatekeepers of liver homeostasis. LSECs display anti-inflammatory and anti-fibrogenic properties by preventing Kupffer cell and hepatic stellate cell activation and regulating hepatic lipid metabolism

[reviewed in (36)]. Early in the course of NAFLD, LSEC capillarization leads to the loss of LSEC fenestrae and alters the transfer of chylomicron remnants to the hepatocytes required for the VLDL synthesis. As a compensatory mechanism, hepatocyte synthesis of cholesterol and triglycerides could be strongly increased. The synthesis and release of nitric oxide (NO) by LSECs also decreases with the dyslipidaemia and insulin resistance, altering the protective and local role of NO in the regulation of hepatocyte lipid content. Indeed, NO limits *de novo* lipogenesis and enhances the beta-oxidation of fatty acid in hepatocytes. During NASH, inflammation and gut microbiota-derived signals could increase the NF- κ B pathway activation in LSECs, which coordinate the release of pro-inflammatory mediators including MCP1, IL1, IL6, TNF α , and the upregulation of adhesion molecules such as vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular adhesion protein-1 (VAP-1). This source of inflammatory mediators will amplify the local inflammation and liver injury by enhancing the hepatic recruitment and activation of leucocytes including macrophages and neutrophils. Altered LSECs also fail to maintain hepatic stellate cell quiescence and release fibrogenic mediators, including Hedgehog signalling molecules, promoting liver fibrosis. The decreased autophagic flux in LSECs, as evaluated by the incidence of autophagic vacuoles, has been recently associated with NASH in patients (42). In a mouse model of NAFLD (high-fat diet), the defect of autophagy in endothelial cells promotes liver inflammation (upregulation of inflammatory markers such as CCL2, CCL5, CD68, VCAM1) and injury (increased cleaved caspase-3 level) in addition to perisinusoidal fibrosis (42). As potential therapeutic approaches against NAFLD, activation of liver autophagy would thus be protective in hepatocytes, liver macrophages and sinusoidal endothelial cells, but detrimental in hepatic stellate cells (61, 62).

Liver Macrophages are Important Drivers of Hepatic Inflammation

The role of the adipose tissue macrophages in the onset and progression of NAFLD by regulating, for example, local and systemic inflammation, insulin resistance, increased lipolysis and secreted pro-inflammatory and pro-fibrogenic adipokines has been well reported. The liver macrophages are also key actors in NAFLD pathogenesis (32, 33, 41). Liver-resident Kupffer cells are in close contact with LSECs in sinusoids and with hepatocytes and hepatic stellate cells in the parenchymal. At the early stage of NAFLD, the increased pro-inflammatory polarization of liver-resident Kupffer cells could contribute to hepatic steatosis and initiate inflammation and the recruitment of other immune cells into the liver. Indeed, the IL1 β secretion by pro-inflammatory-Kupffer cells promotes accumulation of triglyceride in hepatocytes through the inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α)-mediated fat oxidation (63). The decrease in anti-inflammatory macrophages in arginase-2 deficient mice is also sufficient to promote the spontaneous development of liver steatosis mainly via the increase in *de novo* lipogenesis and

inflammation dependent on iNOS (64). The depletion of Kupffer cells also attenuates hepatic steatosis and liver insulin resistance in rats fed high-sucrose or high-fat diets (65). In line with this, the anti-inflammatory Kupffer cells could mediate apoptotic effects towards their pro-inflammatory counterparts have been reported via the IL10 pathway. This could regulate the equilibrium between anti- and pro-inflammatory macrophages in the liver and prevent the early liver manifestation of metabolic syndrome (66). Bacterial products, toxic lipids, and hepatocyte-derived inflammatory mediators could amplify the pro-inflammatory polarization of liver macrophages with the increased chemokines secretion. In addition to resident macrophages, stressed hepatocytes, endothelium, and/or hepatic stellate cells contribute to this upregulation of liver chemokines leading to the recruitment of inflammatory cells (monocytes, neutrophils, lymphocytes) into the liver (67). The striking accumulation of immune cells is one hallmark characteristic of NASH and has been associated with ongoing hepatic inflammation and NAFLD progression (68, 69). With the NAFLD progression, it has been recently reported that the number of resident-Kupffer cells from embryonic progenitors is decreased causing by elevated cell death and are replaced by monocyte-derived Kupffer cells (70). This new pool of kupffer cells are more inflammatory and are important contributor of the impairment of liver responses during NASH (70). Important heterogeneity in liver macrophages from different origins thus exist and could be modify according to the NAFLD progression. This underlines that the regulation of the influx of bone marrow-derived monocyte into the liver is an important event in the onset of liver inflammation and the NAFLD progression (68, 69). For instance, a pattern of upregulated chemokines/chemokine receptors has been reported in NASH patients such as CCL3-5/CCR5 and the chemokines CCL2. The hepatic expression of CD44 and CD62E (E-Selectin), which are also involved in recruitment of leukocyte into inflammation sites, were also strongly upregulated in NASH patients (71, 72). CD44, which interacts with extracellular matrix components (osteopontin, E-selectin, and hyaluronan), regulates the recruitment of macrophages into the liver but also their activation mediated by DAMPs, PAMPs, and saturated fatty acids (72). In human, liver CD44+ cells correlated with NASH, NAS, and liver injury in obese patients (72). The CCL2/CCR2 pair is also a key player in the recruitment of inflammatory monocytes into the injured liver and drives hepatic fibrosis (73, 74). Pharmacological inhibition of CCL2 in murine models of steatohepatitis (MCDD) and chronic hepatic injury (chronic CCl4 treatment) reduced monocyte/macrophage recruitment into the liver and ameliorated hepatic steatosis development (69). CCR2 inhibition by the small molecule inhibitor CCX-872 also decreased the infiltration of CD11b⁺CD11c⁺F4/80⁺ monocytes into the liver and improved glycemic control and liver inflammation, injury and fibrosis in murine models of NAFLD (high fat high fructose diet) (75). Therapeutic treatment with dual antagonist of chemokine receptor CCR2/CCR5, which is under clinical investigation for fibrotic NASH, will be discussed later in the review.

A number of studies using single cell technologies [reviewed in (43)] or specific markers such as C-type lectin CLEC4F, TIM4,

and osteopontin (76–78) highlight the complexity of the NAFLD pathogenesis and role of the liver macrophages. Interestingly, it has been recently identified using single-cell RNA sequencing, a common “NAFLD myeloid phenotype” in mice upon Western diet challenge. The liver monocytes, macrophages, and dendritic cells, as well as bone marrow precursors displayed, for example, the downregulation of the inflammatory marker calprotectin (S100a8/S100a9). In addition, the inflammatory capacity of bone marrow monocytes is modified and this phenotype remains stable and independent of the local micro environment and *in vitro* stimulation with cytokine (79). Current efforts are thus focused on dissecting macrophage heterogeneity and potential NAFLD phenotype according to NAFLD severity to allow the development of more specific therapeutic tools to target “detrimental” macrophages and inflammation.

Innate Lymphoid Cells Are New Participants in NASH

The family of innate lymphoid cells (ILC) represent subsets of innate lymphocytes lacking the receptors of antigen encoded by rearranged genes and expressed on T and B cells. These cells are mainly resident cells in tissue and enriched in the epithelial barrier. ILCs are prompted to respond to various stress signals (pathogens, tumors, and inflammation) and secrete a wide range of cytokines to shape immune responses (80). The ILC family is classified into three groups and five subsets based on cell surface markers, transcriptional factors required for their development and the patterns of producing type 1, type 2, and Th17 associated cytokines: the cytotoxic NK cells and helper-like ILC-1 belonging to group 1 ILC; helper-like ILC-2, the unique group 2 ILC member; helper-like ILC-3 and Lymphocyte Tissue Inducer (LTi) cells belonging to group 3 cells (81). In addition to their role in orchestrating protective immunity, ILC subsets also regulate obesity-associated metabolic diseases and may contribute to NAFLD pathogenesis (24, 82).

Over the last few years, it has been reported that almost all subsets of ILC play an important role in metabolic homeostasis by regulating adipose tissue, liver, and gut functions. Two main studies demonstrated the importance of the IL-33/ILC2 axis in adipose tissue to regulate obesity. Enkephalin and IL13-producing ILC2 promote “beiging” of white adipocytes and increased energy expenditure by regulating eosinophil/alternatively activated macrophage differentiation (83, 84). The IL22 expression by ILC3 subsets was impaired in obese mice. Interestingly, IL22-producing ILC3 or IL22-producing CD4 T cells improved insulin sensitivity, preserved the mucosal barrier of the gut, decreased inflammatory responses, and regulated the lipid metabolism in both adipose tissue and liver (85). The contribution of group 1 ILC in the regulation of adipose tissue inflammation was also established in obese patients and murine models. The NK cells producing IFN- γ were increased in adipose tissue and the depletion of NK cells and/or helper-like ILC1 decreased the number of adipose tissue pro-inflammatory macrophages (86–89). Most recent studies deciphered the phenotypical and functional heterogeneity of adipose tissue

group 1 ILC in human and mouse studies and revealed their complexity.

In response to local IL12 and/or IL15 levels, the group 1 ILC subsets produced IFN- γ and TNF- α and regulated the pool of macrophages into the adipose tissue during obesity (90, 91). Interestingly, the increased susceptibility to infection and cancer related to obesity have been associated with the decrease in anti-cytotoxic properties of NK cells. The lipid accumulation in NK cells and PPAR-mediated mTOR inhibition impaired the NK cells functions (92, 93). In NASH patients, the circulating levels of IL15 and CXCL10 increased compared to lean subjects. These inflammatory mediators are known to trigger group 1 ILC activation (71, 94, 95). While circulating NK cells frequency did not change with the grade of NAFLD (NASH versus steatosis), these cells expressed a higher level of the activating receptor NKG2D and were thus be more sensitive to cell death signals (96). Characterization of tissue group 1 ILC according to the hepatic complications still needs to be improved in patients. However, the contribution of group 1 ILC in NAFLD progression has been established. The liver IFN- γ producing NK cells enhanced macrophage polarization towards a pro-inflammatory phenotype with steatohepatitis (MCDD) (44). In addition, the depletion of group 1 ILC exacerbated the NASH-fibrosis transition confirming the anti-fibrogenic role of NK cells/ILC1 (97). Several studies also reported that elevated CXCL10 and IL15 levels in NASH liver contributed to the recruitment and activation of hepatic NK cells/ILC1 (98, 99). The frequency of NK cells in liver could also be regulated by their conversion into the less cytotoxic ILC1-like phenotype during NASH in response to elevated TGF- β (100). The mechanisms regulating the functions of the ILCs and their crosstalk with the other immune cells during NAFLD/NASH deserve more attention in the future to better understand NAFLD pathogenesis.

Involvement of Neutrophils in NAFLD Pathogenesis

Neutrophils have a well-established role in alcoholic liver diseases (101), and could also be actors contributing in the onset and progression of NASH. Indeed, it has been reported that the targeting of neutrophils (depletion, inhibition of activity, or recruitment) reduced liver inflammation in obesity and steatohepatitis contexts. The depletion of neutrophils via a specific antibody (1A8 targeting Ly6G molecule) improves metabolic parameters and hepatic steatosis and inflammation associated with a reduction of the body weight in HFD mice (102). Neutrophil elastase deficiency decreases the liver steatosis and inflammation in Western diet fed mice (103), while the myeloperoxidase (MPO) deletion ameliorates hepatic inflammation and fibrosis in HFD mice (104). The increased MPO secretion by leukocytes could directly promote hepatocyte injury and hepatic stellate cell activation (45). Neutrophil derived peptides may also contribute to the NAFLD progression. Transgenic mice expressing human neutrophil peptide 1 displayed an exacerbation of hepatic stellate proliferation and fibrosis when fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet

(105). Furthermore, neutrophil extracellular traps (NETs), which limit infection by entrapping pathogens, have been linked to chronic sterile inflammation. Van der Windt *et al.* have recently reported that the circulating levels of markers of NETs increase in NASH patients and the liver NET formation occurs at the early stage of the NAFLD (before the influx of monocyte-derived macrophages) in mice. Finally, the inhibition of the NET formation protects mice from hepatic inflammation and NASH-driven HCC (46).

The development and progression of NAFLD are thus multifactorial and multi-organ. The chronic inflammation is a key player and its indirect or direct targeting as therapeutic approaches will be successively discussed.

GLOBAL APPROACHES AGAINST NAFLD/NASH

Lifestyle changes are a promising therapeutic approach against NAFLD and would optimize the action of the future pharmacological treatments when they are combined. Indeed, recent reviews summarize the benefits of nutritional management and physical activity on NAFLDs (106, 107). Weight reductions of $\geq 10\%$ has been associated with the resolution of NASH, in many cases, and the improvement of fibrosis by at least one stage. The modest weight loss ($>5\%$) is also associated with benefits on some items encompassed in the NAFLD activity score (NAS). For example, a 5% reduction in BMI has been associated with 25% reduction in fat in liver according to a Magnetic Resonance Imaging (MRI) measurement (108), with up to complete correction after few weeks under a strictly hypocaloric diet. These global approaches are associated with the improvement of systemic inflammation, adipose tissue inflammation, insulin-sensitivity, and gut functions (eubiosis, integrity, metabolites, and hormones) contributing to the normalization of the insulin-sensitivity and lipid profile. However, the ideal diet (the Mediterranean diet has been proposed as one such diet) and the most effective regular physical activity are yet to be defined by long-term studies. These adapted lifestyle modifications towards a healthy diet and habitual physical activity would also be a therapeutic approach to reduce NAFLD and its cardiovascular and renal complications.

Regarding the impact of the bariatric surgery on NAFLD (109, 110), a recent meta-analysis including 32 cohort studies with 3093 paired liver biopsies reported a resolution of steatosis, inflammation, ballooning degeneration and fibrosis in 66, 50, 76, and in 40% of patients, respectively. In line with this, mean NAFLD activity score was also reduced after bariatric surgery. The included studies in this analysis were conducted between 1995 and 2018 with 5 retrospective and 17 prospective cohort studies employing different bariatric procedures. The median follow-up duration was of 15 months (3–55 months), with an absolute percentage of BMI reduction of 24.98% after surgery (110). Recent longitudinal studies with paired liver biopsies also reported the beneficial effects of bariatric surgery against NASH in a long term. One study reported that Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass surgery resulted in correction hepatic steatosis,

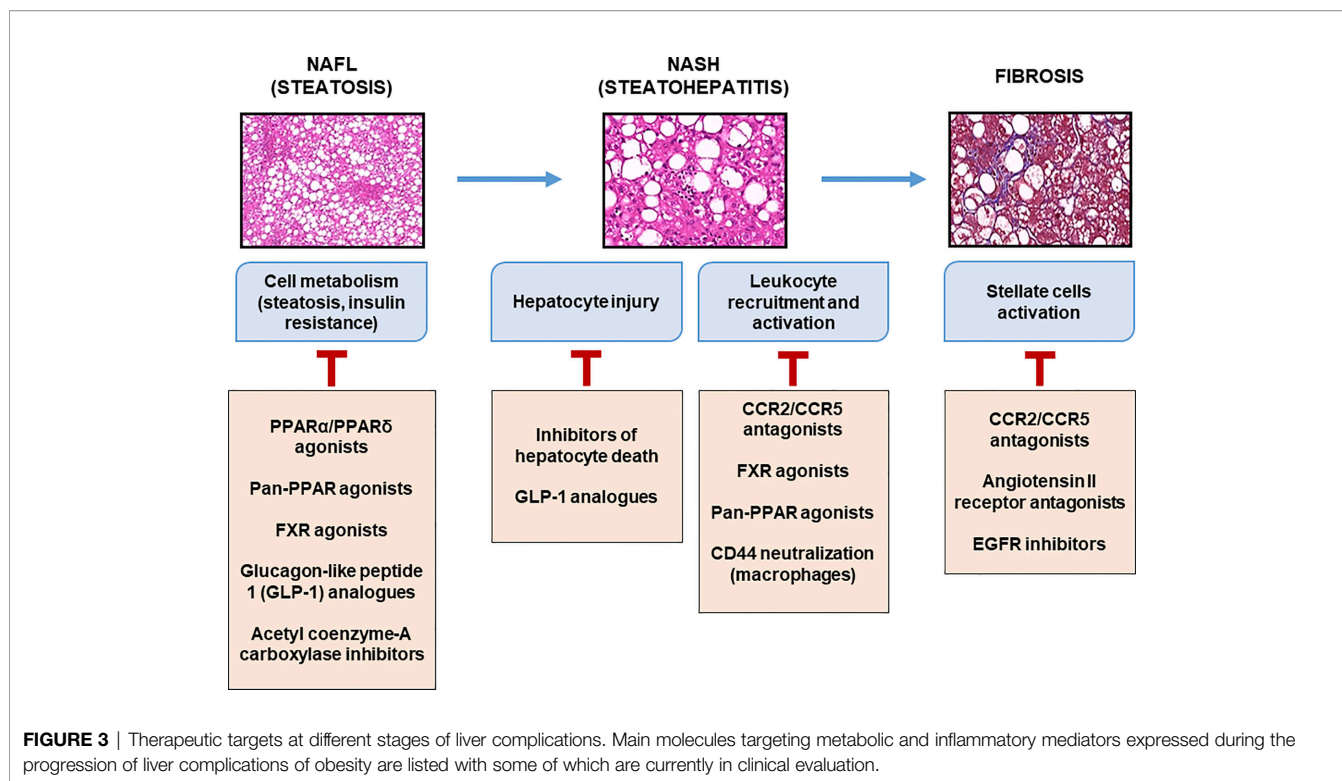
inflammation, hepatocellular ballooning, and liver injury as evaluated by alanine aminotransferase and liver activated cleaved caspase-3 levels after a median follow-up of 55 months. Interestingly, the hepatocyte apoptosis as evaluated by serum caspase-generated keratin-18 fragment levels already improved one year after the gastric surgery (111). Recently, a study evaluated the impact of bariatric surgery (including different procedures) in biopsy-proven NASH patients at 1 and 5 years after the surgery. From the analysis of the sequential liver biopsies, NASH resolution were observed in 84% of cases after 5 years and the reduction of hepatic fibrosis was progressively decreased at 1 year and then 5 years after the bariatric surgery (112). Since the efficacy of bariatric surgery on NASH in patients with $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$ looks promising and efficient, the extension of bariatric surgery indication to patients with a BMI of less than 35 kg/m^2 is currently being considered. In line with this, the FDA (Food & Drug Administration) has recently approved gastric band indication for obese patients ($\text{BMI} 30\text{--}35 \text{ kg/m}^2$) with severe type 2 diabetes.

PHARMACOLOGICAL TARGETS AGAINST NASH

In the near future, pharmacological innovations may be available for patients with fibrotic-NASH. An increasing number of pre-clinical and clinical studies are in progress targeting “metabolism-inflammation-fibrogenesis”. Some compounds target hepatocyte deaths (driver of inflammation; pan-caspase inhibitor, etc.), inflammation and/or fibrosis (CCR2/CCR5 antagonist, galectin-3 inhibitor, etc.), others the metabolism (PPAR pan-agonists, FGF21 agonists, ACC inhibitor, etc.), or the gut-liver axis (FXR agonists, non-tumorigenic analogues of FGF19, etc.) (113). The combination of two or more of these compounds is a rational strategy that is currently under development. The impacts of some of these pharmacology strategies on inflammation are discussed below (Figure 3).

Targeting the Liver Injury (Hepatocyte Death)

As previously described, different types of hepatocyte death have been associated with NAFLD progression and drive hepatic inflammation (40). The targeting of apoptotic caspases such as the pan-caspase inhibitor Emricasan, while effective in preclinical studies (114), did not improve clinical aspects nor NASH features in NASH patients with fibrosis but, to the contrary, could aggravate fibrosis and hepatocyte ballooning (115, 116) (ENCORE-PH and ENCORE-NF trials; Phase II). Likewise, targeting of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) did not prevent fibrosis in NASH patients with severe fibrosis. It has been demonstrated that ASK1, by regulating the sustained activation of JNK, is an important mediator of hepatocyte death and inflammation in hepatocytes and macrophages in preclinical and *in vitro* studies. The proof-of-concept study evaluating selonsertib (an ASK1 inhibitor) after



24 weeks also reported an improvement of hepatic fibrosis but not ballooning or inflammation (117). However, two placebo-controlled phase III trials in NASH patients with compensated cirrhosis or with bridging fibrosis (STELLAR-4 and -3 trials, respectively) recently reported that Selonsertib did not improve fibrosis as evaluated by noninvasive tests without worsening of NASH after 24 weeks (118). Altogether, these studies could allow us to exclude the ASK1 inhibition strategy for burned out NASH (severe fibrosis). Both of these strategies (inhibition of pro-apoptotic caspases and ASK1) also indicate that prevention of apoptosis may have caused the stressed hepatocytes to enter alternative modes of cell death such as necrosis, necroptosis and pyroptosis (more deleterious by generating more inflammatory mediators). For example, the pan caspase inhibition by Emricasan in pre-treated acute myeloid leukemia cells with an apoptosis enhancer (birinapant) enhances necroptosis at the expense of apoptosis (119). Decrease in caspase 8 activity by Emricasan could explain this shift of cell death by removing the inhibition of necroptosis by caspase 8. New inhibitors targeting necroptosis and pyroptosis are currently being evaluated but particular attention should also be paid to their impact on other modes of cell death which can negate the desired therapeutic benefits.

Inhibition of Monocyte-Derived Macrophage Recruitment

Limiting the pool of recruited monocyte-derived macrophages is also a promising therapeutic strategy. For example, CD44 neutralization by specific antibody decreases macrophages infiltration into adipose tissue, weight gain, fasting glycaemia,

insulin resistance and hepatic steatosis in a dietary mouse model of obesity (120). In addition, CD44 neutralization partially corrects liver injury and inflammation associated with decreased liver neutrophils and macrophages in rodent model of diet-induced steatohepatitis (72). The approaches targeting the CD44 functions or expression in macrophages, for example, could be thus beneficial against NASH. Regarding the CCR2/CCL2 and CCR5/CCL5 systems, an oral dual CCR2/CCR5 antagonist, ceniciviroc (CVC), has been developed and is currently being evaluated in NASH patients. CVC treatment decreased the recruitment of Ly-6C⁺ monocyte-derived macrophages into the liver in mouse models of steatohepatitis (MCDD or Western diet) and ameliorated insulin resistance and liver steatosis. Moreover, CVC treatment improved histological NASH features and liver fibrosis without delaying fibrosis resolution after injury cessation (68). Indeed, subsets of macrophages (Ly6C^{low} restorative macrophages) are also associated with the resolution of fibrosis by secreting anti-inflammatory cytokines and collagen degrading factors (33). In addition, prolonged high-dose CVC therapy (14 weeks) in choline deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet (CDAHFD) mice, augmented the frequency of intrahepatic anti-inflammatory macrophages without impacting the total intrahepatic macrophage populations and decreased liver fibrosis. The beneficial effect of CVC on fibrosis has been associated with its direct effect on hepatic stellate cells. Indeed, CVC treatment prevented the pro-fibrotic gene signature mediated by transforming growth factor- β in primary mouse hepatic stellate cells (121). In addition to CCR2 inhibition, CCR5 inhibition by CVC could be involved in the prevention the activation, migration and proliferation of hepatic stellate cells (74, 122). CCR5 deficiency reduced hepatic fibrosis mediated by bile duct

ligation (122) and CCL5 inhibition displayed similar effects in the carbon tetrachloride rodent model (123). Inhibitor of CCR5 (Maraviror) also arrested cell cycle progression and decreased the accumulation of collagen in the human stellate cell line (124). Among the molecules directly targeting inflammation in clinical trials in phase 2/3 [inhibition of plasma Amine Oxidase Copper-containing 3 (BI 1467335, Boehringer, phase 2) and Galectin 3, a lectin family member (GR-MD-02, Galectin Therapeutics, phase 2)], only CVC (CCR2/CCR5 antagonist, Allergan) is currently under evaluation in a phase III trial in fibrotic NASH patients. In a phase II trial in 289 patients with NASH, CVC therapy for one year was associated with improvement in hepatic fibrosis without worsening of NASH in large part of the patients compared with placebo (125). Results of the phase IIb study of belaepectin (Galectin 3 inhibitor) assessed in 162 patients with NASH, portal hypertension and cirrhosis has been recently published. Unfortunately, one year of biweekly infusion of belaepectin was not associated with a significant reduction in hepatic venous pressure gradient or fibrosis compared with placebo (126). In a rodent model of NAFLD, inhibitors of galectin 3 prevented hepatic fibrosis, possibly via macrophages (127). Several other compounds targeting the CCR2/CCL2 and/or CCR5/CCL5 systems will likely be evaluated in fibrotic-NASH patients, either alone or combined with other drugs.

When Metabolism Meets Inflammation

Over the last decade, it has been well established that the metabolism of immune cells drives their immune responses and/or polarizations. The modulation of the activity of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family members has been linked to the improvement of insulin sensitivity and reduction of NAFLD in preclinical studies. PPAR γ agonists are insulin sensitizers that act mainly in adipose tissues by increasing a pool of insulin-sensitive adipocytes. Since agonists of PPAR γ also enhance the anti-inflammatory polarization of macrophages, these agonists also display anti-inflammatory actions in an obesity context (128–130). Several clinical trials have suggested effective PPAR γ agonist pioglitazone activity against NASH, but clinical limitations of this drug have been reported relative to the weight gain, the risk of bladder cancer, and potential aggravation of heart failure (131–133).

Regarding recent PPAR- γ agonist, twenty-four-week treatment of type 2 diabetes patients with NAFLD with Lobeglitazone has been associated with a modest weight gain (compare to pioglitazone) and the improvement of glucose homeostasis, lipid profile but also hepatic steatosis. Unfortunately, Its efficacy against NASH still needs to be assessed due to the absence of biopsy-proven NASH in these studies (134–136). PPAR α is significantly expressed in liver and regulates metabolism such as bile acid synthesis, ketogenesis, fatty acid uptake, beta oxidation, and triglyceride turnover (137). Importantly, PPAR α also displays anti-inflammatory effects by regulating the NF- κ B pathway (138). Regarding the last isoform, PPAR δ is most highly expressed in muscle but also in adipose tissue and liver. In muscle, the role of PPAR δ has been mainly associated with the regulation of mitochondrial metabolism and beta oxidation (139). Regarding its hepatic expression, PPAR δ is expressed in hepatocytes but also

in hepatic macrophages and stellate cells suggesting its potential contribution in the regulation of liver inflammation and fibrosis (137). Moreover, PPAR δ also shifts the Kupffer cells polarization to an anti-inflammatory phenotype (140).

To target both PPAR α and PPAR δ pathways, dual agonists has been generated such as elafibranor (also known as GFT505). It is important to underline that Elafibranor displays 10 times more affinity for PPAR α than PPAR δ . In animal models of NASH, elafibranor treatment decreased the numbers of macrophage in the liver (141). In a phase II trial in NASH patients, elafibranor treatment was associated with a greater resolution of NASH compared with placebo without worsening the liver fibrosis (142). However, GENFIT recently reported the intermediate results from the phase III trial (RESOLVE-IT) evaluating elafibranor (120 mg elafibranor once daily) compared to placebo in fibrotic NASH patients (biopsy-proven NAS \geq 4 and F2/F3) with a follow-up liver biopsy at week 72. The response rate relative to resolution of NASH with not worsening of fibrosis (primary endpoint) was 19.2% in elafibranor arm (138/717patients) to 14.7% for placebo arm (52/353 patients) without achieving statistical significance ($p = 0.0659$). Regarding fibrosis improvement of at least one stage, the response rate was 24.5% in elafibranor arm (176/717 patients) and 22.4% in the placebo arm (79/353 patients) ($p = 0.4457$). In addition, endpoints related to improvement of at least one stage and changes in metabolic parameters (triglycerides, HDL cholesterol, non-HDL cholesterol, LDL cholesterol, HOMA-IR in non-diabetic patients, and HbA1c in diabetic patients) did not achieve statistical significance. While elafibranor did not exhibit a statistically significant effect on NASH resolution, other clinical trials with different co-agonists of PPAR are currently under investigation in NASH patients [PPAR α/γ agonism (Saroglitazar, Zydus, phase II) and PPAR $\alpha/\gamma/\delta$ agonism (Lanifibranor, Inventiva, phase II), etc.]. From recent Inventiva's press release regarding the Phase IIb NATIVE clinical trial in NASH patients, the pan-PPAR agonist Lanifibranor meets a statistically significant decrease ($p = 0.004$) in at least two points in the SAF activity score (combining hepatocellular inflammation and ballooning), compared to baseline, with no worsening of fibrosis at the dose of 1,200 mg/day (49% in Lanifibranor arm versus 27% in the placebo arm) after 24 weeks of treatment. Lanifibranor also meets multiple key secondary endpoints including fibrosis improvement (by at least one stage without NASH worsening), insulin resistance (decreased in insulin, fasting glucose, Hb1Ac), lipid profiles (decreased in insulin, fasting glucose, Hb1Ac and triglycerides and increased in HDL), and liver injury (decreased in ALT, AST, and GGT).

Other drugs indirectly affect inflammation in NAFLD. The agonist of farnesoid X receptor (FXR) such as obeticholic acid improves liver lipid and glucose metabolism and dampens liver inflammation and fibrosis in NAFLD. In addition, FXR agonists decreases the expression of pro-inflammatory cytokines in macrophages and hepatic inflammation in a mouse model of NAFLD (143). FXR agonists could also enhance the anti-inflammatory polarization of the macrophages *in vitro* and *in vivo* (144). In The Lancet, Younossi *et al.* recently reported the intermediates outcomes (after 18-month of treatment) of a

phase III study evaluating the safety and efficacy of daily dose of 10 or 25 mg of obeticholic acid in 931 patients (with 58% females) with F2/3 fibrosis (fibrosis evaluated on liver biopsy) (145). In NASH patients, obeticholic acid (at 25 mg) significantly improved liver fibrosis and some items of NASH disease activity. Although these encouraging results of this phase III trial, some questions persist (the long-term clinical benefits of treatment of NASH, metabolic consequences, management of side effects including pruritus and elevated LDL cholesterol in patients with elevated risk of cardiovascular disease, etc.).

CONCLUSION

Our understanding of the pathogenesis of NAFLD with global and specific outcomes is in constant progress. The advances in *in vitro* and *in vivo* approaches are also important issues. With their own limitations, these complementary approaches allow to better highlight novel actors and mechanisms involved in the onset and progression of liver complications. Novel animal models and specific cell isolation combined with single-cell RNA sequencing are examples (146). Liver organoids also emerge as alternative system with multiple hepatic cell types which mimic liver structure and diseases (147). For example, liver organoids from human pluripotent stem cells could be used as model of NAFLD liver when stimulated with free-fatty acids (148). Primary liver organoids according to the severity of NASH have also been successfully generated from mice. These different NASH organoids also display the upregulation of TNF α and IL1 β at the early stage of NASH, for example (149). Pre-clinical studies and some clinical trials demonstrate promising results but also underline the complex nature of these chronic liver diseases. Combined metabolic improvement with the regulation of specific inflammatory responses are important clues. The impacts on NAFLD of targeting the GLP1 and hepatic thyroid hormone (thyroid hormone receptor- β) pathways are under clinical

evaluation. Promising investigations are currently deciphering the pathways that regulate both hepatocyte death (more specifically lytic cell death) and metabolism but also control inflammation (necroptosis). In addition, the development of new strategies to regulate the immune system and gut microbiota interactions are also promising therapeutic strategies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CL, MB, PL, RA, and PG wrote and edited the paper and approved the final submitted draft. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by grants from INSERM (France), charities [Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF) to PG, Société Francophone du Diabète (SFD) to PG, SFD/Roche Pharma to PG]. This work was also funded by the French Government (National Research Agency, ANR): #ANR-18-CE14-0019-02, ANR-19-CE14-0044-01 and through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE (#ANR-11-LABX-0028-01) and the UCA^{JEDI} Investments in the Future project (#ANR-15-IDEX-01). MB is supported by the ANR (#ANR-18-CE14-0019-02).

ACKNOWLEDGMENTS

Our thanks to Abby Cuttriss from the Office of International Scientific Visibility for comments on the English version of the manuscript.

REFERENCES

1. Eslam M, Sanyal AJ, George J International Consensus Panel. MAFLD: A consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. *Gastroenterology* (2020) 158:1999–2014. doi: 10.1053/j.gastro.2019.11.312
2. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol* (2020) 73 (1):202–9. doi: 10.1016/j.jhep.2020.03.039
3. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* (2016) 64(1):73–84. doi: 10.1002/hep.28431
4. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, Paik JM, Srishord M, Fukui N, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* (2019) 71(4):793–801. doi: 10.1016/j.jhep.2019.06.021
5. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* (2011) 378(9793):804–14. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60813-1
6. Samuel VT, Shulman GI. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metab* (2018) 27(1):22–41. doi: 10.1016/j.cmet.2017.08.002
7. Raff EJ, Kakati D, Bloomer JR, Shoreibah M, Rasheed K, Singal AK. Diabetes Mellitus Predicts Occurrence of Cirrhosis and Hepatocellular Cancer in Alcoholic Liver and Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. *J Clin Transl Hepatol* (2015) 3(1):9–16. doi: 10.14218/JCTH.2015.00001
8. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* (2010) 363(14):1341–50. doi: 10.1056/NEJMra0912063
9. Lallukka S, Yki-Jarvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (2016) 30(3):385–95. doi: 10.1016/j.beem.2016.06.006
10. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Halpern Z, Oren R. Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. *Liver Int* (2006) 26(7):856–63. doi: 10.1111/j.1478-3231.2006.01311.x
11. Yang JD, Abdelmalek MF, Pang H, Guy CD, Smith AD, Diehl AM, et al. Gender and menopause impact severity of fibrosis among patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* (2014) 59(4):1406–14. doi: 10.1002/hep.26761
12. Koehler EM, Schouten JN, Hansen BE, van Rooij FJ, Hofman A, Stricker BH, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in the

- elderly: results from the Rotterdam study. *J Hepatol* (2012) 57(6):1305–11. doi: 10.1016/j.jhep.2012.07.028
13. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology* (2015) 148(3):547–55. doi: 10.1053/j.gastro.2014.11.039
 14. Younossi Z, Stepanova M, Ong JP, Jacobson IM, Bugianesi E, Duseja A, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Fastest Growing Cause of Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplant Candidates. *Clin Gastroenterol Hepatol* (2019) 17(7):1748–1755. doi: 10.1016/j.cgh.2018.05.057
 15. Tran A, Gual P. Non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* (2013) 37(1):17–29. doi: 10.1016/j.clinre.2012.07.005
 16. Ruhl CE, Everhart JE. Trunk fat is associated with increased serum levels of alanine aminotransferase in the United States. *Gastroenterology* (2010) 138(4):1346–1356. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.053
 17. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* (2003) 112(12):1821–30. doi: 10.1172/JCI19451
 18. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* (2003) 112(12):1796–808. doi: 10.1172/JCI19246
 19. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* (2009) 15(8):921–9. doi: 10.1038/nm.2001
 20. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* (2009) 15(8):914–20. doi: 10.1038/nm.1964
 21. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* (2009) 15(8):930–9. doi: 10.1038/nm.2002
 22. Patsouris D, Li PP, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab* (2008) 8(4):301–9. doi: 10.1016/j.cmet.2008.08.015
 23. Bertola A, Ciucci T, Rousseau D, Bourlier V, Duffaut C, Bonnafous S, et al. Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing th17 responses in mice and patients. *Diabetes* (2012) 61(9):2238–47. doi: 10.2337/db11-1274
 24. Luci C, Vieira E, Perchet T, Gual P, Golub R. Natural Killer Cells and Type 1 Innate Lymphoid Cells Are New Actors in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Immunol* (2019) 10:1192. doi: 10.3389/fimmu.2019.01192
 25. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* (2005) 115(5):1343–51. doi: 10.1172/JCI23621
 26. Grabherr F, Grander C, Effenberger M, Adolph TE, Tilg H. Gut Dysfunction and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2019) 10:611. doi: 10.3389/fendo.2019.00611
 27. Zmora N, Bashiardes S, Levy M, Elinav E. The Role of the Immune System in Metabolic Health and Disease. *Cell Metab* (2017) 25(3):506–21. doi: 10.1016/j.cmet.2017.02.006
 28. Schwenger KJ, Clermont-Dejean N, Allard JP. The role of the gut microbiome in chronic liver disease: the clinical evidence revised. *JHEP Rep* (2019) 1(3):214–26. doi: 10.1016/j.jhepr.2019.04.004
 29. Lelouvier B, Servant F, Paise S, Brunet AC, Benyahya S, Serino M, et al. Changes in blood microbiota profiles associated with liver fibrosis in obese patients: A pilot analysis. *Hepatology* (2016) 64(6):2015–27. doi: 10.1002/hep.28829
 30. Sookoian S, Salatiello A, Castano GO, Landa MS, Fijalkowky C, Garaycochea M, et al. Intrahepatic bacterial metatranscriptomic signature in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* (2020) 69(8):1483–91. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318811
 31. Cai J, Zhang XJ, Li H. The Role of Innate Immune Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* (2019) 70(3):1026–37. doi: 10.1002/hep.30506
 32. Kazanokov K, Jorgensen SMD, Thomsen KL, Moller HJ, Vilstrup H, George J, et al. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2019) 16(3):145–59. doi: 10.1038/s41575-018-0082-x
 33. Lefere S, Tacke F. Macrophages in obesity and non-alcoholic fatty liver disease: Crosstalk with metabolism. *JHEP Rep* (2019) 1(1):30–43. doi: 10.1016/j.jhepr.2019.02.004
 34. Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver—from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2016) 13(2):88–110. doi: 10.1038/nrgastro.2015.200
 35. Sutti S, Albano E. Adaptive immunity: an emerging player in the progression of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2020) 17(2):81–92. doi: 10.1038/s41575-019-0210-2
 36. Hammoutene A, Rautou PE. Role of liver sinusoidal endothelial cells in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* (2019) 70(6):1278–91. doi: 10.1016/j.jhep.2019.02.012
 37. Kurioka A, Walker LJ, Klenerman P, Willberg CB. MAIT cells: new guardians of the liver. *Clin Transl Immunol* (2016) 5(8):e98. doi: 10.1038/cti.2016.51
 38. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* (2008) 47(2):729–36. doi: 10.1002/hep.22034
 39. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* (2013) 14(10):996–1006. doi: 10.1038/ni.2691
 40. Gautheron J, Gores GJ, Rodrigues CMP. Lytic cell death in metabolic liver disease. *J Hepatol* (2020) 73(2):394–408. doi: 10.1016/j.jhep.2020.04.001
 41. Ibrahim SH, Hirsova P, Gores GJ. Non-alcoholic steatohepatitis pathogenesis: sublethal hepatocyte injury as a driver of liver inflammation. *Gut* (2018) 67(5):963–72. doi: 10.1136/gutjnl-2017-315691
 42. Hammoutene A, Biquard L, Lasselín J, Kheloufi M, Tanguy M, Vion AC, et al. A defect in endothelial autophagy occurs in patients with non-alcoholic steatohepatitis and promotes inflammation and fibrosis. *J Hepatol* (2020) 72(3):528–38. doi: 10.1016/j.jhep.2019.10.028
 43. Remmerie A, Martens L, Scott CL. Macrophage Subsets in Obesity, Aligning the Liver and Adipose Tissue. *Front Endocrinol* (2020) 11:259. doi: 10.3389/fendo.2020.00259
 44. Tosello-Trampont AC, Krueger P, Narayanan S, Landes SG, Leitinger N, Hahn YS. Nkp46(+) natural killer cells attenuate metabolism-induced hepatic fibrosis by regulating macrophage activation in mice. *Hepatology* (2016) 63(3):799–812. doi: 10.1002/hep.28389
 45. Pulli B, Ali M, Iwamoto Y, Zeller MW, Schob S, Linnola JJ, et al. Myeloperoxidase-Hepatocyte-Stellate Cell Cross Talk Promotes Hepatocyte Injury and Fibrosis in Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis. *Antioxid Redox Signal* (2015) 23(16):1255–69. doi: 10.1089/ars.2014.6108
 46. van der Windt DJ, Sud V, Zhang H, Varley PR, Goswami J, Yazdani HO, et al. Neutrophil extracellular traps promote inflammation and development of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* (2018) 68(4):1347–60. doi: 10.1002/hep.29914
 47. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV Jr, Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100(6):3077–82. doi: 10.1073/pnas.0630588100
 48. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* (2007) 45(6):1366–74. doi: 10.1002/hep.21655
 49. Amin NB, Carvajal-Gonzalez S, Purkal J, Zhu T, Crowley C, Perez S, et al. Targeting diacylglycerol acyltransferase 2 for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Transl Med* (2019) 11(520):eaav9701. doi: 10.1126/scitranslmed.aav9701
 50. Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J Hepatol* (2018) 68(2):268–79. doi: 10.1016/j.jhep.2017.09.003
 51. Krawczyk M, Liebe R, Lammert F. Toward Genetic Prediction of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Trajectories: PNPLA3 and Beyond. *Gastroenterology* (2020) 158(7):1865–80. doi: 10.1053/j.gastro.2020.01.053
 52. Sans A, Bonnafous S, Rousseau D, Patoureaux S, Canivet CM, Leclere PS, et al. The Differential Expression of Cide Family Members is Associated with Nafld Progression from Steatosis to Steatohepatitis. *Sci Rep* (2019) 9(1):7501. doi: 10.1038/s41598-019-43928-7
 53. Eguchi A, Wree A, Feldstein AE. Biomarkers of liver cell death. *J Hepatol* (2014) 60(5):1063–74. doi: 10.1016/j.jhep.2013.12.026

54. Anty R, Iannelli A, Patouraux S, Bonnafous S, Lavallard VJ, Senni-Buratti M, et al. A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther* (2010) 32(11-12):1315–22. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04480.x
55. Aravinthan A, Scarpini C, Tachtatzis P, Verma S, Penrhyn-Lowe S, Harvey R, et al. Hepatocyte senescence predicts progression in non-alcohol-related fatty liver disease. *J Hepatol* (2013) 58(3):549–56. doi: 10.1016/j.jhep.2012.10.031
56. Ogronnik M, Miwa S, Tchkonja T, Tiniakos D, Wilson CL, Lahat A, et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun* (2017) 8:15691. doi: 10.1038/ncomms15691
57. Papatheodoridi AM, Chrysavgis L, Koutsilieris M, Chatzigeorgiou A. The Role of Senescence in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Progression to Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* (2020) 71(1):363–74. doi: 10.1002/hep.30834
58. Zhao GN, Zhang P, Gong J, Zhang XJ, Wang PX, Yin M, et al. Tmbim1 is a multivesicular body regulator that protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice and monkeys by targeting the lysosomal degradation of Tlr4. *Nat Med* (2017) 23(6):742–52. doi: 10.1038/nm.4334
59. Garcia-Martinez I, Santoro N, Chen Y, Hoque R, Ouyang X, Caprio S, et al. Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9. *J Clin Invest* (2016) 126(3):859–64. doi: 10.1172/JCI83885
60. Etienne-Mesmin L, Vijay-Kumar M, Gewirtz AT, Chassaing B. Hepatocyte Toll-Like Receptor 5 Promotes Bacterial Clearance and Protects Mice Against High-Fat Diet-Induced Liver Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* (2016) 2(5):584–604. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.04.007
61. Gual P, Gilgenkrantz H, Lotersztajn S. Autophagy in chronic liver diseases: the two faces of Janus. *Am J Physiol Cell Physiol* (2017) 312(3):C263–73. doi: 10.1152/ajpcell.00295.2016
62. Lavallard VJ, Gual P. Autophagy and non-alcoholic fatty liver disease. *BioMed Res Int* (2014) 2014:120179. doi: 10.1155/2014/120179
63. Stienstra R, Saudale F, Duval C, Keshtkar S, Groener JE, van Rooijen N, et al. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology* (2010) 51(2):511–22. doi: 10.1002/hep.23337
64. Navarro LA, Wree A, Povero D, Berk MP, Eguchi A, Ghosh S, et al. Arginase 2 deficiency results in spontaneous steatohepatitis: a novel link between innate immune activation and hepatic de novo lipogenesis. *J Hepatol* (2015) 62(2):412–20. doi: 10.1016/j.jhep.2014.09.015
65. Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, et al. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* (2010) 59(2):347–57. doi: 10.2337/db09-0016
66. Wan J, Benkdane M, Teixeira-Clerc F, Bonnafous S, Louvet A, Lafdil F, et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* (2014) 59(1):130–42. doi: 10.1002/hep.26607
67. Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* (2014) 147(3):577–94.e571. doi: 10.1053/j.gastro.2014.06.043
68. Krenkel O, Puengel T, Govaere O, Abdallah AT, Mossanen JC, Kohlhepp M, et al. Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis. *Hepatology* (2018) 67(4):1270–83. doi: 10.1002/hep.29544
69. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* (2012) 61(3):416–26. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300304
70. Tran S, Baba I, Poupel L, Dussaud S, Moreau M, Gelineau A, et al. Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis. *Immunity* (2020) 53(3):627–40.e625. doi: 10.1016/j.immuni.2020.06.003
71. Bertola A, Bonnafous S, Anty R, Patouraux S, Saint-Paul MC, Iannelli A, et al. Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One* (2010) 5(10):e13577. doi: 10.1371/journal.pone.0013577
72. Patouraux S, Rousseau D, Bonnafous S, Lebaupin C, Luci C, Canivet CM, et al. CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* (2017) 67(2):328–38. doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.003
73. Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C, et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* (2009) 50(1):261–74. doi: 10.1002/hep.22950
74. Seki E, de Minicis S, Inokuchi S, Taura K, Miyai K, van Rooijen N, et al. CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* (2009) 50(1):185–97. doi: 10.1002/hep.22952
75. Parker R, Weston CJ, Miao Z, Corbett C, Armstrong MJ, Ertl L, et al. CC chemokine receptor 2 promotes recruitment of myeloid cells associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2018) 314(4):G483–93. doi: 10.1152/ajpgi.00213.2017
76. Scott CL, Zheng F, De Baetselier P, Martens L, Saeys Y, De Prijck S, et al. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat Commun* (2016) 7:10321. doi: 10.1038/ncomms10321
77. Morinaga H, Mayoral R, Heinrichsdorff J, Osborn O, Franck N, Hah N, et al. Characterization of distinct subpopulations of hepatic macrophages in HFD/obese mice. *Diabetes* (2015) 64(4):1120–30. doi: 10.2337/db14-1238
78. Remmerie A, Martens L, Thone T, Castoldi A, Seurinck R, Pavie B, et al. Osteopontin Expression Identifies a Subset of Recruited Macrophages Distinct from Kupffer Cells in the Fatty Liver. *Immunity* (2020) 53(3):641–57.e614. doi: 10.1016/j.immuni.2020.08.004
79. Krenkel O, Hundertmark J, Abdallah AT, Kohlhepp M, Puengel T, Roth T, et al. Myeloid cells in liver and bone marrow acquire a functionally distinct inflammatory phenotype during obesity-related steatohepatitis. *Gut* (2020) 69(3):551–63. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318382
80. Barrow AD, Colonna M. Innate lymphoid cell sensing of tissue vitality. *Curr Opin Immunol* (2019) 56:82–93. doi: 10.1016/j.coi.2018.11.004
81. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* (2018) 174(5):1054–66. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.017
82. Yang D, Yang W, Tian Z, van Velkinburgh JC, Song J, Wu Y, et al. Innate lymphoid cells as novel regulators of obesity and its-associated metabolic dysfunction. *Obes Rev* (2016) 17(6):485–98. doi: 10.1111/obr.12397
83. Brestoff JR, Kim BS, Saenz SA, Stine RR, Monticelli LA, Sonnenberg GF, et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* (2015) 519(7542):242–6. doi: 10.1038/nature14115
84. Lee MW, Odegaard JI, Mukundan L, Qiu Y, Molofsky AB, Nussbaum JC, et al. Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* (2015) 160(1-2):74–87. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.011
85. Wang X, Ota N, Manzanillo P, Kates L, Zavala-Solorio J, Eidschenk C, et al. Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature* (2014) 514(7521):237–41. doi: 10.1038/nature13564
86. O'Rourke RW, Meyer KA, Neeley CK, Gaston GD, Sekhri P, Szumowski M, et al. Systemic NK cell ablation attenuates intra-abdominal adipose tissue macrophage infiltration in murine obesity. *Obes (Silver Spring)* (2014) 22(10):2109–14. doi: 10.1002/oby.20823
87. O'Rourke RW, White AE, Metcalf MD, Winters BR, Diggs BS, Zhu X, et al. Systemic inflammation and insulin sensitivity in obese IFN-gamma knockout mice. *Metabolism* (2012) 61(8):1152–61. doi: 10.1016/j.metabol.2012.01.018
88. Wensveen FM, Jelencic V, Valentic S, Sestan M, Wensveen TT, Theurich S, et al. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat Immunol* (2015) 16(4):376–85. doi: 10.1038/ni.3120
89. Lee BC, Kim MS, Pae M, Yamamoto Y, Eberle D, Shimada T, et al. Adipose Natural Killer Cells Regulate Adipose Tissue Macrophages to Promote Insulin Resistance in Obesity. *Cell Metab* (2016) 23(4):685–98. doi: 10.1016/j.cmet.2016.03.002
90. O'Sullivan TE, Rapp M, Fan X, Weizman OE, Bhardwaj P, Adams NM, et al. Adipose-Resident Group 1 Innate Lymphoid Cells Promote Obesity-Associated Insulin Resistance. *Immunity* (2016) 45(2):428–41. doi: 10.1016/j.immuni.2016.06.016
91. Boulouvar S, Michelet X, Duquette D, Alvarez D, Hogan AE, Dold C, et al. Adipose Type One Innate Lymphoid Cells Regulate Macrophage Homeostasis through Targeted Cytotoxicity. *Immunity* (2017) 46(2):273–86. doi: 10.1016/j.immuni.2017.01.008
92. Viel S, Besson L, Charrier E, Marçais A, Disse E, Bienvenu J, et al. Alteration of Natural Killer cell phenotype and function in obese individuals. *Clin Immunol* (2017) 177:12–7. doi: 10.1016/j.clim.2016.01.007

93. Michelet X, Dyck L, Hogan A, Loftus RM, Duquette D, Wei K, et al. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. *Nat Immunol* (2018) 19(12):1330–40. doi: 10.1038/s41590-018-0251-7
94. Zhang X, Shen J, Man K, Chu ES, Yau TO, Sung JC, et al. CXCL10 plays a key role as an inflammatory mediator and a non-invasive biomarker of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* (2014) 61(6):1365–75. doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.006
95. Marcias A, Viel S, Grau M, Henry T, Marvel J, Walzer T. Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. *Front Immunol* (2013) 4:450. doi: 10.3389/fimmu.2013.00450
96. Stiglund N, Strand K, Cornillet M, Stal P, Thorell A, Zimmer CL, et al. Retained NK Cell Phenotype and Functionality in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Immunol* (2019) 10:1255. doi: 10.3389/fimmu.2019.01255
97. Fasbender F, Widera A, Hengstler JG, Watzl C. Natural Killer Cells and Liver Fibrosis. *Front Immunol* (2016) 7:19. doi: 10.3389/fimmu.2016.00019
98. Cepero-Donates Y, Lacraz G, Ghobadi F, Rakotoarivelo V, Orkhis S, Mayhue M, et al. Interleukin-15-mediated inflammation promotes non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine* (2016) 82:102–11. doi: 10.1016/j.cyt.2016.01.020
99. Fan Y, Zhang W, Wei H, Sun R, Tian Z, Chen Y. Hepatic NK cells attenuate fibrosis progression of non-alcoholic steatohepatitis in dependent of CXCL10-mediated recruitment. *Liver Int* (2020) 40(3):598–608. doi: 10.1111/liv.14307
100. Cuff AO, Sillito F, Dertschnig S, Hall A, Luong TV, Chakraverty R, et al. The Obese Liver Environment Mediates Conversion of NK Cells to a Less Cytotoxic ILC1-Like Phenotype. *Front Immunol* (2019) 10:2180. doi: 10.3389/fimmu.2019.02180
101. Gao B, Ahmad MF, Nagy LE, Tsukamoto H. Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* (2019) 70(2):249–59. doi: 10.1016/j.jhep.2018.10.023
102. Ou R, Liu J, Lv M, Wang J, Wang J, Zhu L, et al. Neutrophil depletion improves diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Endocrine* (2017) 57(1):72–82. doi: 10.1007/s12020-017-1323-4
103. Chen J, Liang B, Bian D, Luo Y, Yang J, Li Z, et al. Knockout of neutrophil elastase protects against western diet induced nonalcoholic steatohepatitis in mice by regulating hepatic ceramides metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* (2019) 518(4):691–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.08.111
104. Rensen SS, Bieghs V, Xanthoulea S, Arfianti E, Bakker JA, Shiri-Sverdlov R, et al. Neutrophil-derived myeloperoxidase aggravates non-alcoholic steatohepatitis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *PLoS One* (2012) 7(12):e52411. doi: 10.1371/journal.pone.0052411
105. Ibusuki R, Uto H, Arima S, Mawatari S, Setoguchi Y, Iwashita Y, et al. Transgenic expression of human neutrophil peptide-1 enhances hepatic fibrosis in mice fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Liver Int* (2013) 33(10):1549–56. doi: 10.1111/liv.12203
106. Romero-Gomez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol* (2017) 67(4):829–46. doi: 10.1016/j.jhep.2017.05.016
107. Marchesini G, Petta S, Dalle Grave R. Diet, weight loss, and liver health in nonalcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, evidence, and practice. *Hepatology* (2016) 63(6):2032–43. doi: 10.1002/hep.28392
108. Patel NS, Doycheva I, Peterson MR, Hooker J, Kisselva T, Schnabl B, et al. Effect of weight loss on magnetic resonance imaging estimation of liver fat and volume in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* (2015) 13(3):561–8.e561. doi: 10.1016/j.cgh.2014.08.039
109. Laursen TL, Hagemann CA, Wei C, Kazankov K, Thomsen KL, Knop FK, et al. Bariatric surgery in patients with non-alcoholic fatty liver disease - from pathophysiology to clinical effects. *World J Hepatol* (2019) 11(2):138–49. doi: 10.4254/wjh.v11.i2.138
110. Lee Y, Doumouras AG, Yu J, Brar K, Banfield L, Gmora S, et al. Complete Resolution of Nonalcoholic Fatty Liver Disease After Bariatric Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* (2019) 17(6):1040–60.e1011. doi: 10.1016/j.cgh.2018.10.017
111. Schneck AS, Anty R, Patouraux S, Bonnafous S, Rousseau D, Lebeaupin C, et al. Roux-En Y Gastric Bypass Results in Long-Term Remission of Hepatocyte Apoptosis and Hepatic Histological Features of Non-alcoholic Steatohepatitis. *Front Physiol* (2016) 7:344. doi: 10.3389/fphys.2016.00344
112. Lassailly G, Caiazzo R, Ntandja-Wandji LC, Gnemmi V, Baud G, Verkindt H, et al. Bariatric Surgery Provides Long-term Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis and Regression of Fibrosis. *Gastroenterology* (2020) 159(4):1290–301.e1295. doi: 10.1053/j.gastro.2020.06.006
113. Tacke F, Weiskirchen R. An update on the recent advances in antifibrotic therapy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* (2018) 12(11):1143–52. doi: 10.1080/17474124.2018.1530110
114. Barreiro FJ, Holod S, Finocchietto PV, Camino AM, Aquino JB, Avagnina A, et al. The pan-caspase inhibitor Emricasan (IDN-6556) decreases liver injury and fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* (2015) 35(3):953–66. doi: 10.1111/liv.12570
115. Garcia-Tsao G, Bosch J, Kayali Z, Harrison SA, Abdelmalek MF, Lawitz E, et al. Randomized placebo-controlled trial of emricasan for non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis with severe portal hypertension. *J Hepatol* (2020) 72(5):885–95. doi: 10.1016/j.jhep.2019.12.010
116. Harrison SA, Goodman Z, Jabbar A, Vemulapalli R, Younes ZH, Freilich B, et al. A randomized, placebo-controlled trial of emricasan in patients with NASH and F1-F3 fibrosis. *J Hepatol* (2020) 72(5):816–27. doi: 10.1016/j.jhep.2019.11.024
117. Loomba R, Lawitz E, Mantry PS, Jayakumar S, Caldwell SH, Arnold H, et al. The ASK1 inhibitor selonsertib in patients with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, phase 2 trial. *Hepatology* (2018) 67(2):549–59. doi: 10.1002/hep.29514
118. Harrison SA, Wong VW, Okanoue T, Bzowej N, Vuppalanchi R, Younes Z, et al. Selonsertib for patients with bridging fibrosis or compensated cirrhosis due to NASH: Results from randomized phase III STELLAR trials. *J Hepatol* (2020) 73(1):26–39. doi: 10.1016/j.jhep.2020.02.027
119. Brumatti G, Ma C, Lalaoui N, Nguyen NY, Navarro M, Tanzer MC, et al. The caspase-8 inhibitor emricasan combines with the SMAC mimetic birinapant to induce necroptosis and treat acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med* (2016) 8(339):339ra369. doi: 10.1126/scitranslmed.aad3099
120. Kodama K, Toda K, Morinaga S, Yamada S, Butte AJ. Anti-CD44 antibody treatment lowers hyperglycemia and improves insulin resistance, adipose inflammation, and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes* (2015) 64(3):867–75. doi: 10.2337/db14-0149
121. Kruger AJ, Fuchs BC, Masia R, Holmes JA, Salloum S, Sojoodi M, et al. Prolonged cenicriviroc therapy reduces hepatic fibrosis despite steatohepatitis in a diet-induced mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* (2018) 67(5):1754–67. doi: 10.1002/hep.29477
122. Seki E, De Minicis S, Gwak GY, Kluwe J, Inokuchi S, Bursill CA, et al. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *J Clin Invest* (2009) 119(7):1858–70. doi: 10.1172/jci37444
123. Berres ML, Koenen RR, Rueland A, Zaldivar MM, Heinrichs D, Sahin H, et al. Antagonism of the chemokine Ccl5 ameliorates experimental liver fibrosis in mice. *J Clin Invest* (2010) 120(11):4129–40. doi: 10.1172/JCI41732
124. Coppola N, Perna A, Lucariello A, Martini S, Macera M, Carleo MA, et al. Effects of treatment with Maraviroc a CCR5 inhibitor on a human hepatic stellate cell line. *J Cell Physiol* (2018) 233(8):6224–31. doi: 10.1002/jcp.26485
125. Friedman SL, Ratzliff V, Harrison SA, Abdelmalek MF, Aithal GP, Caballeria J, et al. A randomized, placebo-controlled trial of cenicriviroc for treatment of nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis. *Hepatology* (2018) 67(5):1754–67. doi: 10.1002/hep.29477
126. Chalasani N, Abdelmalek MF, Garcia-Tsao G, Vuppalanchi R, Alkhoury N, Rinella M, et al. Effects of Belaspentin, an Inhibitor of Galectin-3, in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis With Cirrhosis and Portal Hypertension. *Gastroenterology* (2020) 158(5):1334–45.e1335. doi: 10.1053/j.gastro.2019.11.296
127. Traber PG, Zomer E. Therapy of experimental NASH and fibrosis with galectin inhibitors. *PLoS One* (2013) 8(12):e83481. doi: 10.1371/journal.pone.0083481
128. Feng X, Qin H, Shi Q, Zhang Y, Zhou F, Wu H, et al. Chrysin attenuates inflammation by regulating M1/M2 status via activating PPARgamma. *Biochem Pharmacol* (2014) 89(4):503–14. doi: 10.1016/j.bcp.2014.03.016
129. Luo W, Xu Q, Wang Q, Wu H, Hua J. Effect of modulation of PPAR-gamma activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* (2017) 7:44612. doi: 10.1038/srep44612
130. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, et al. Macrophage-specific PPARgamma

- controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* (2007) 447(7148):1116–20. doi: 10.1038/nature05894
131. Boettcher E, Csako G, Pucino F, Wesley R, Loomba R. Meta-analysis: pioglitazone improves liver histology and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* (2012) 35(1):66–75. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04912.x
 132. Cusi K, Orsak B, Bril F, Lomonaco R, Hecht J, Ortiz-Lopez C, et al. Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Trial. *Ann Intern Med* (2016) 165(5):305–15. doi: 10.7326/M15-1774
 133. He S, Tang YH, Zhao G, Yang X, Wang D, Zhang Y. Pioglitazone prescription increases risk of bladder cancer in patients with type 2 diabetes: an updated meta-analysis. *Tumour Biol* (2014) 35(3):2095–102. doi: 10.1007/s13277-013-1278-x
 134. Lee YH, Kim JH, Kim SR, Jin HY, Rhee EJ, Cho YM, et al. Lobe-glitzazone, a Novel Thiazolidinedione, Improves Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Type 2 Diabetes: Its Efficacy and Predictive Factors Related to Responsiveness. *J Korean Med Sci* (2017) 32(1):60–9. doi: 10.3346/jkms.2017.32.1.60
 135. Kim SG, Kim DM, Woo JT, Jang HC, Chung CH, Ko KS, et al. Efficacy and safety of lobe-glitzazone monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus over 24-weeks: a multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, placebo controlled trial. *PLoS One* (2014) 9(4):e92843. doi: 10.1371/journal.pone.0092843
 136. Kim SH, Kim SG, Kim DM, Woo JT, Jang HC, Chung CH, et al. Safety and efficacy of lobe-glitzazone monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus over 52 weeks: An open-label extension study. *Diabetes Res Clin Pract* (2015) 110(3):e27–30. doi: 10.1016/j.diabres.2015.09.009
 137. Liss KH, Finck BN. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimie* (2017) 136:65–74. doi: 10.1016/j.biochi.2016.11.009
 138. Vanden Berghe W, Vermeulen L, Delerive P, De Bosscher K, Staels B, Haegeman G. A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR. *Adv Exp Med Biol* (2003) 544:181–96. doi: 10.1007/978-1-4419-9072-3_22
 139. Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100(26):15924–9. doi: 10.1073/pnas.0306981100
 140. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* (2008) 7(6):496–507. doi: 10.1016/j.cmet.2008.04.003
 141. Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, Rigou G, Delataille P, Millatt LJ, et al. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* (2013) 58(6):1941–52. doi: 10.1002/hep.26461
 142. Ratziu V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Leheret P, Serfaty L, et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha and -delta, Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* (2016) 150(5):1147–59.e1145. doi: 10.1053/j.gastro.2016.01.038
 143. Yao J, Zhou CS, Ma X, Fu BQ, Tao LS, Chen M, et al. FXR agonist GW4064 alleviates endotoxin-induced hepatic inflammation by repressing macrophage activation. *World J Gastroenterol* (2014) 20(39):14430–41. doi: 10.3748/wjg.v20.i39.14430
 144. McMahan RH, Wang XX, Cheng LL, Krisko T, Smith M, El Kasmi K, et al. Bile acid receptor activation modulates hepatic monocyte activity and improves nonalcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* (2013) 288(17):11761–70. doi: 10.1074/jbc.M112.446575
 145. Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, Rinella M, Anstee QM, Goodman Z, et al. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* (2019) 394(10215):2184–96. doi: 10.1016/S0140-6736(19)33041-7
 146. Torres S, Abdullah Z, Brol MJ, Hellerbrand C, Fernandez M, Fiorotto R, et al. Recent Advances in Practical Methods for Liver Cell Biology: A Short Overview. *Int J Mol Sci* (2020) 21(6):2027. doi: 10.3390/ijms21062027
 147. Prior N, Inacio P, Huch M. Liver organoids: from basic research to therapeutic applications. *Gut* (2019) 68(12):2228–37. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319256
 148. Ramli MNB, Lim YS, Koe CT, Demircioglu D, Tng W, Gonzales KAU, et al. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids as Models of Liver Disease. *Gastroenterology* (2020) 159(4):1471–86.e1412. doi: 10.1053/j.gastro.2020.06.010
 149. Elbadawy M, Yamanaka M, Goto Y, Hayashi K, Tsunedomi R, Hazama S, et al. Efficacy of primary liver organoid culture from different stages of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) mouse model. *Biomaterials* (2020) 237:119823. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.119823

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

Copyright © 2020 Luci, Bourinet, Leclère, Anty and Gual. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

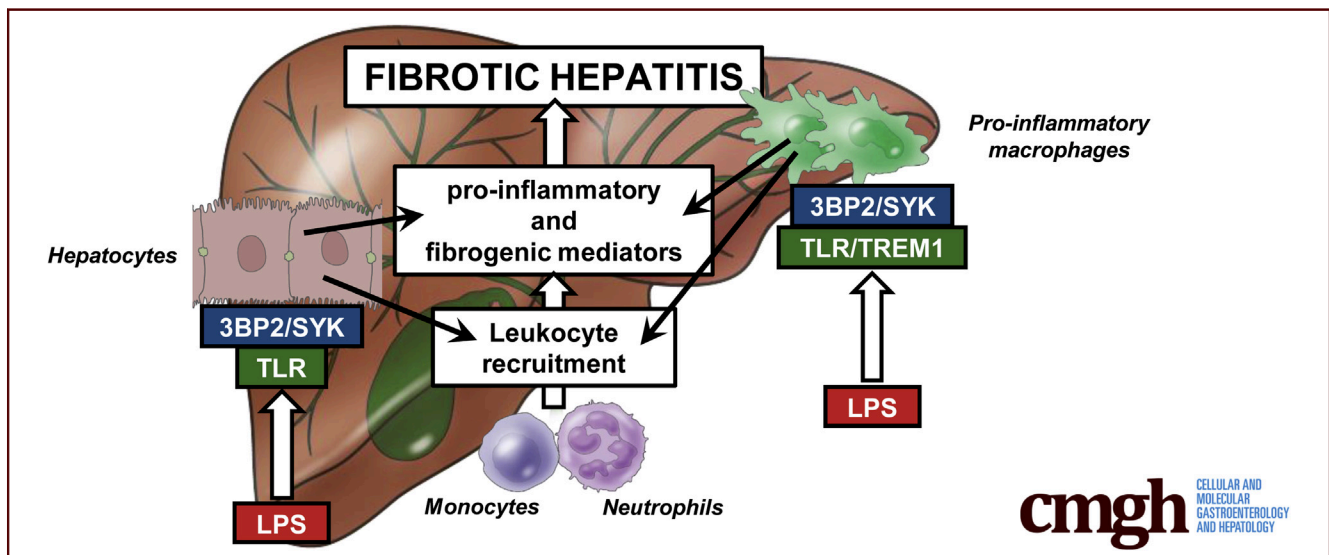
ORIGINAL RESEARCH

SYK-3BP2 Pathway Activity in Parenchymal and Myeloid Cells Is a Key Pathogenic Factor in Metabolic Steatohepatitis



Carmelo Luci,^{1,a} Elodie Vieira,^{1,a} Manon Bourinet,¹ Déborah Rousseau,¹ Stéphanie Bonnafous,² Stéphanie Patouraux,² Lauren Lefevre,¹ Frederic Larbret,¹ Virginie Prod'homme,¹ Antonio Iannelli,² Albert Tran,² Rodolphe Anty,² Béatrice Bailly-Maitre,¹ Marcel Deckert,^{1,b} and Philippe Gual^{1,b}

¹Université Côte d'Azur, INSERM, U1065, C3M, Nice, France; and ²Université Côte d'Azur, CHU, INSERM, U1065, C3M, Nice, France



SUMMARY

This work reports that SYK-3BP2 pathway activity enhances the LPS-TLR4 responses in both hepatocytes and resident liver macrophages. This initiates the onset of local inflammation and contributes to liver accumulation of leukocytes. Targeting of 3BP2 or SYK prevents metabolic steatohepatitis features.

BACKGROUND & AIMS: Spleen tyrosine kinase (SYK) signaling pathway regulates critical processes in innate immunity, but its role in parenchymal cells remains elusive in chronic liver diseases. We investigate the relative contribution of SYK and its substrate c-Abl Src homology 3 domain-binding protein-2 (3BP2) in both myeloid cells and hepatocytes in the onset of metabolic steatohepatitis.

METHODS: Hepatic SYK-3BP2 pathway was evaluated in mouse models of metabolic-associated fatty liver diseases (MAFLD) and in obese patients with biopsy-proven MAFLD (n = 33). Its role in liver complications was evaluated in *Sh3bp2* KO and myeloid-specific *Syk* KO mice challenged with

methionine and choline deficient diet and in homozygous *Sh3bp2*^{KI/KI} mice with and without SYK expression in myeloid cells.

RESULTS: Here we report that hepatic expression of 3BP2 and SYK correlated with metabolic steatohepatitis severity in mice. 3BP2 deficiency and SYK deletion in myeloid cells mediated the same protective effects on liver inflammation, injury, and fibrosis priming upon diet-induced steatohepatitis. In primary hepatocytes, the targeting of 3BP2 or SYK strongly decreased the lipopolysaccharide-mediated inflammatory mediator expression and 3BP2-regulated SYK expression. In homozygous *Sh3bp2*^{KI/KI} mice, the chronic inflammation mediated by the proteasome-resistant 3BP2 mutant promoted severe hepatitis and liver fibrosis with augmented liver SYK expression. In these mice, the deletion of SYK in myeloid cells was sufficient to prevent these liver lesions. The hepatic expression of SYK is also up-regulated with metabolic steatohepatitis and correlates with liver macrophages in biopsy-proven MAFLD patients.

CONCLUSIONS: Collectively, these data suggest an important role for the SYK-3BP2 pathway in the pathogenesis of chronic liver inflammatory diseases and highlight its targeting in hepatocytes and myeloid cells as a potential strategy to treat

metabolic steatohepatitis. (*Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2022;13:173–191; <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.08.004>)

Keywords: SYK; 3BP2; TREM1; TLR4; MAFLD; NASH; Fibrosis.

Metabolic-associated fatty liver diseases (MAFLD)¹ are the most common chronic liver diseases worldwide, with a global prevalence of 25%.² The burden of MAFLD is increasing in parallel with the global obesity epidemic³ and still presents an unmet medical need with no approved pharmacologic therapies. MAFLD is a broad term that encompasses the full spectrum of fatty liver diseases from simple hepatic steatosis to metabolic steatohepatitis, fibrosis/cirrhosis, and hepatocellular cancer. Obesity and metabolic syndrome are also associated with the development of MAFLD. Similarly, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, hypertension, and weight gain are risk factors for MAFLD progression.^{4,5} However, the inverse relationship also exists, with MAFLD being a risk factor for many metabolic diseases including type 2 diabetes⁶ and cardiovascular diseases.⁷


In addition to genetic and environmental factors, the interaction of gut and adipose tissue with the liver enhances liver metabolic disorders (steatosis and insulin resistance), chronic inflammation, and injury-mediated fibrosis.^{8,9} In MAFLD liver, a large number of innate immune cells are involved in the onset of the chronic inflammation, including resident and recruited macrophages and neutrophils but also parenchymal hepatocytes.^{8,9} Stressed hepatocytes, such as fatty and sub-lethal hepatocytes, take on an immune function by sensing excessive metabolite levels and pathogen- and damage-associated molecular patterns (PAMPs and DAMPs, respectively), which in turn elicit inflammatory events associated with metabolic dysfunction.¹⁰ Macrophages also play a central role in the development and progression of MAFLD.^{11,12} Liver-resident macrophages (Kupffer cells) can initiate inflammation and help to recruit blood-derived monocytes. The polarization of both resident and recruited macrophages into pro-inflammatory phenotypes subsequently promotes MAFLD progression. The gut-derived endotoxins, lipids, and molecules associated with hepatocellular damage and death (DAMPs, extracellular vesicles, apoptotic bodies, etc) are the main factors contributing to macrophage and hepatic stellate cell (HSC) activation and the regulation of chronic hepatitis and fibrogenesis. To study pathways that are conserved in both hepatocytes and macrophages and involved in the steatosis-steatohepatitis transition, we focused on the role of the spleen tyrosine kinase (SYK) pathway in the regulation of inflammatory mediators.

SYK is a cytoplasmic non-receptor tyrosine kinase, and SYK-dependent signaling is known to regulate critical processes in innate and adaptive immunity downstream immunoreceptors (including B-cell receptors, T-cell receptors, and Fc receptors), C-type lectins receptors, integrins, and toll-like receptors (TLRs).^{13–16} In the liver, SYK is highly expressed in HSCs and inflammatory cells including macrophages.^{17,18} SYK is also overexpressed in balloon

hepatocytes containing Mallory-Denk bodies,¹⁹ a hallmark of chronic liver diseases such as MAFLD and alcoholic liver diseases. Recent studies have reported a pathogenic role for SYK in liver fibrosis,^{17,18} as previously reported in certain fibrotic-related diseases including scleroderma, renal fibrosis, and rheumatoid arthritis.^{20–22} SYK inhibitors blocked HSC activation *in vitro* and in animal models of hepatic fibrosis, including toxin challenge (carbon tetrachloride, thioacetamide [TAA], N-nitrosodiethylamine)- and bile duct ligation-induced liver fibrosis models.¹⁷ In addition, SYK inhibitors potently attenuated liver fibrosis and hepatocellular carcinoma development in N-nitrosodiethylamine and N-nitrosodiethylamine/carbon tetrachloride animal models.^{17,18} Interestingly, SYK deletion in the myeloid compartment conferred protection against fibrogenic progression upon TAA-mediated liver injury.¹⁸ The regulation of macrophage activity by SYK in the context of liver injury and exacerbated by DAMPs could provide an attractive mechanism in chronic liver diseases. This exacerbated activation of macrophages by TLR ligands (DAMPs, PAMPs, and saturated lipids) was found to be a central pathogenic mechanism for chronic inflammation and MAFLD. In addition, TREM1, a member of the triggering receptors expressed on myeloid cells (TREM) family that mediates the inflammatory response through TLR4, DNAX-activation protein of 12 kDa (DAP12), and SYK, has been implicated in liver diseases.^{23–25} In line with the important role of the SYK pathway in inflammatory diseases, gain-of-function mutations in SYK, leading to increased phosphorylation and hyperactivated downstream signaling, were recently associated with immune dysfunction and systemic inflammation.²⁶ Among the components of the SYK pathway,¹³ we have previously shown that 3BP2 (also known as SH3 binding protein 2), a cytoplasmic adapter that interacts with SYK,^{27–30} was necessary for TLR-mediated activation of macrophages in response to PAMPs and DAMPs. Indeed, 3BP2-deficient macrophages exhibited dramatically reduced inflammatory responses to microbial challenge and reduced phagocytosis.³¹ Remarkably, mutations in *SH3BP2* that were found in the human genetic disease cherubism³² have been associated in mice with systemic autoinflammation, SYK hyperphosphorylation, and elevated TLR signaling in

^aAuthors share co-first authorship; ^bAuthors share co-senior authorship.

Abbreviations used in this paper: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; 3BP2, c-Abl Src homology 3 domain-binding protein-2; DAMP, damage-associated molecular pattern; HFD, high-fat diet; HSC, hepatic stellate cell; LPS, lipopolysaccharide; MAFLD, metabolic-associated fatty liver diseases; MCDD, methionine and choline deficient diet; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PCR, polymerase chain reaction; PPAR α , peroxisome proliferator activated receptor alpha; SD, standard deviation; SYK, spleen tyrosine kinase; TAA, thioacetamide; TLR4, toll-like receptor 4; TNF, tumor necrosis factor; TREM, triggering receptors expressed on myeloid cells; Wt, wild-type.

 Most current article

© 2021 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of the AGA Institute. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

2352-345X

<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.08.004>

myeloid cells carrying homozygous *Sh3bp2* cherubic mutations (*Sh3bp2*^{K1/K1} animals).^{31,33–35} Furthermore, we found that a hemizygous *Sh3bp2* cherubic mutation enhanced macrophage responsiveness to TLR ligands.³¹ Importantly, both deletion of SYK in myeloid cells³⁶ and targeting the SYK/3BP2 axis³⁷ ameliorated the chronic inflammation driven by the mutation of 3BP2 in mice.

Although SYK and its signaling partner 3BP2 are expressed in liver tissue, many details are still elusive, such as their relative local expression in response to liver status and their relative pathogenic roles in hepatocytes and macrophages throughout the development of liver steatosis and progression to steatohepatitis. We thus investigated these open questions in different mouse models of MAFLD, human MAFLD samples, and transgenic animals deficient in 3BP2 or SYK signaling or with sustained activation of 3BP2 signaling (cherubic 3BP2 mutants).

Results

Hepatic Expression of 3BP2 and SYK Correlated With Liver Complications in Mouse Models of MAFLD

We first evaluated the hepatic expression levels of *Sh3bp2*, *Syk*, and macrophage marker *Emr1* (F4/80) in a dietary mouse model of obesity and hepatic steatosis. After 33 weeks of high-fat diet (HFD), the wild-type C57BL/6 (Wt) mice developed obesity, hepatic injury as evaluated by alanine aminotransferase (ALT) activity, and severe hepatic steatosis (Figure 1A–C). The hepatic expression levels of *Syk* and *Emr1* were increased upon 33 weeks of HFD (Figure 1D) and hepatic expression of *Syk* correlated with hepatic steatosis, ALT activity, and hepatic expression of *Emr1* (Figure 1E). The hepatic expression levels of *Sh3bp2* tended to increase with liver complications (Figure 1D). To subsequently investigate the behavior of the 3BP2 and SYK in response to the progression and the severity of the MAFLD, we monitored hepatic expression in Wt mice fed a diet deficient in methionine and choline (MCDD) for 2 and 7 weeks. The duration of the MCDD challenge correlates with the severity of the steatohepatitis associated with the aggravation of liver injury and fibrogenesis. At 2 weeks, mice developed moderate hepatic steatosis with mild hepatic inflammation (as evaluated by the inflammatory foci number) and liver injury (Figure 2A–C). The long-lasting MCDD challenge (7 weeks) aggravated the liver complications with severe steatosis, inflammation, and liver injury (Figure 2A–C). Hepatic *Sh3bp2* and *Syk* expression levels were progressively increased with the MAFLD severity (Figure 2D). Hepatic *Sh3bp2* and *Syk* also strongly correlated with hepatic steatosis, inflammatory foci number, liver injury, and hepatic expression of *Emr1* (Figure 2E). Upon 7 weeks of MCDD challenge, the increased *Syk* expression was due to the up-regulation of both isoforms of *Syk* (*Syk-b* (S) and *Syk* (L)) (the latter being the main isoform expressed in liver) (Figure 2F). The hepatic expression levels of SYK were also increased upon MCDD at the protein level (Figure 2G). We then evaluated which cell types in the liver were responsible for 3BP2 and SYK expression. *Sh3bp2* and

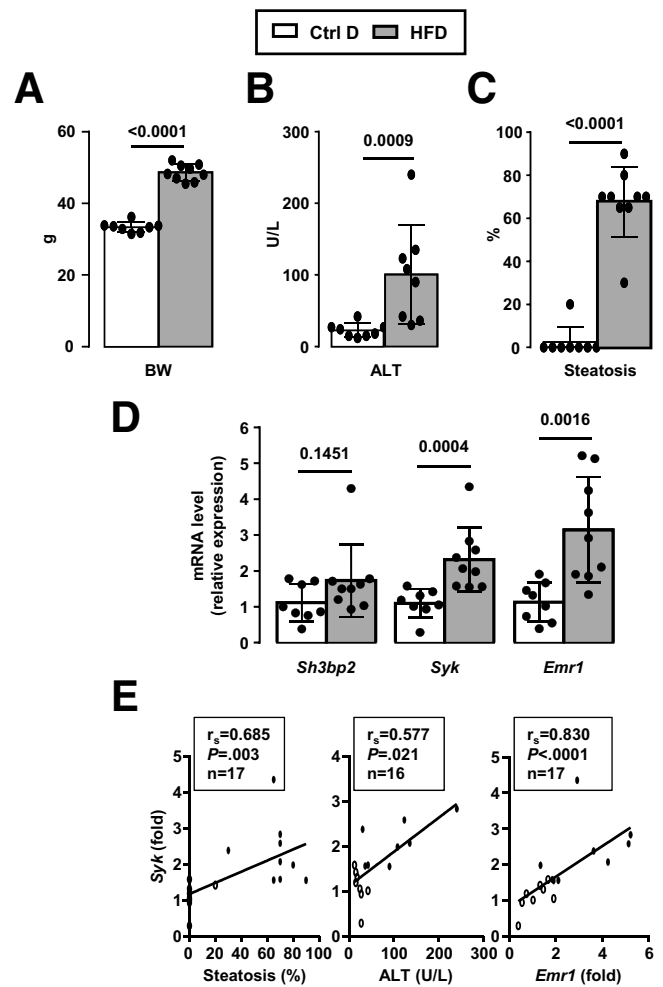
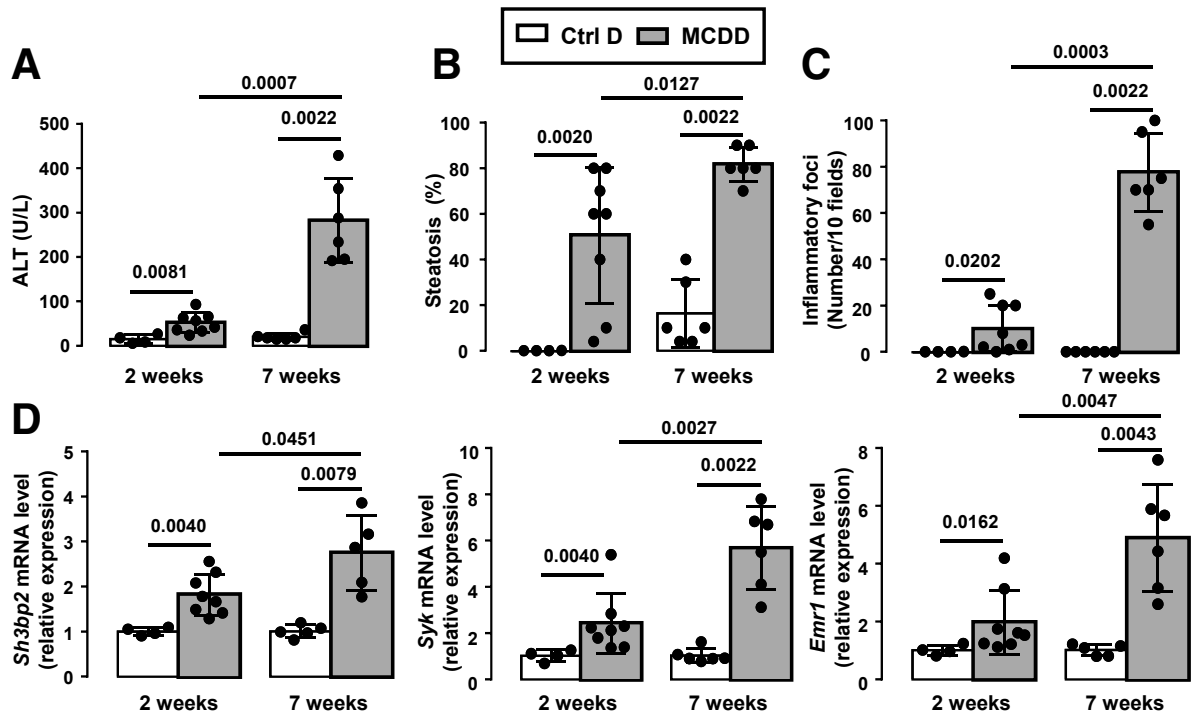


Figure 1. Hepatic expression of SYK correlated with hepatic steatosis, liver injury, and macrophage marker expression in HFD-fed mice. Wild-type mice fed a control diet (Ctrl D) or HFD for 33 weeks (8–9 mice/group). Body weight (BW) (A), serum ALT activity (B), and hepatic steatosis (on H&E stained liver tissue section) (C) have been evaluated. (D) Hepatic expression of *Sh3bp2*, *Syk*, and *Emr1* was evaluated in mice as indicated by mRNA level. Gene expression values were normalized to mRNA levels of *36b4*. Results are expressed relative to expression level in controls. (E) Correlation between hepatic expression of *Syk* with hepatic steatosis (%), ALT activity, and hepatic *Emr1* expression were analyzed using the Spearman's correlation test. (A–D) Results are expressed as means \pm standard deviation (SD) and statistically analyzed using the Mann-Whitney test.

Syk expression at the mRNA level was detected in hepatocytes and non-parenchymal fraction from non-pathogenic liver in lean mice (Figure 2H). *Sh3bp2* was expressed at higher levels than *Syk* in hepatocytes. In addition, *Sh3bp2* and *Syk* were highly expressed in non-parenchymal cells compared with *Syk* expression in hepatocytes with higher expression of *Syk* than *Sh3bp2*. Therefore, these results indicate that 3BP2 and SYK could impact the functions of both hepatocytes and non-parenchymal cells. In addition, the up-regulation of 3BP2 and SYK with MAFLD severity suggests a potential role in the steatosis-steatohepatitis transition.

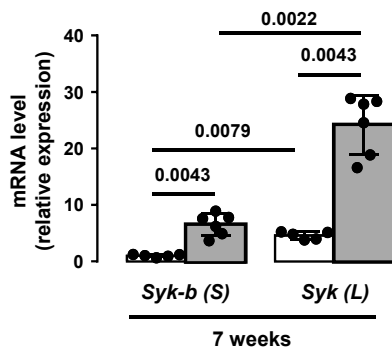


E

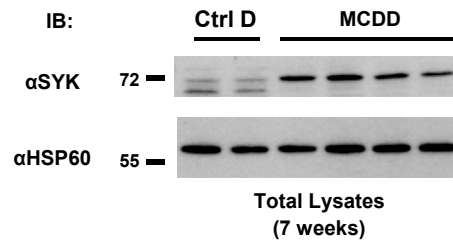
	Steatosis (%)			ALT (U/L)			Inflammatory foci (Nb/10 fields)			Liver <i>Emr1</i> (fold)		
	r	P	N	r	P	N	r	P	N	r	P	N
Liver <i>Sh3bp2</i> (fold)	0.900	<0.0001	22	0.802	<0.0001	22	0.826	0.0001	22	0.870	<0.0001	22
Liver <i>Syk</i> (fold)	0.876	<0.0001	24	0.802	<0.0001	24	0.901	<0.0001	24	0.938	<0.0001	24

Spearman's rank correlation test.

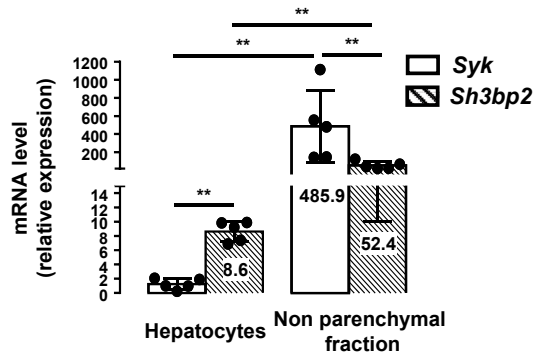
F



G



H



3BP2 Deficiency Partially Prevented Liver Injury, Hepatic Steatosis, and Steatohepatitis Induced by MCDD Challenge

The role of 3BP2 in liver injury and steatohepatitis induced by MCDD was then investigated using mice deficient for 3BP2. The MCDD challenge was associated with elevated hepatic *Sh3bp2* expression in Wt mice (Figure 3A). The *Sh3bp2*^{-/-} mice displayed less liver damage as shown by the lower ALT activity levels (Figure 3B). Furthermore, histologic analyses demonstrated less hepatic steatosis and inflammatory foci in the livers of MCDD-fed *Sh3bp2*^{-/-} mice compared with livers of MCDD-fed Wt mice (Figure 3C and D). The decreased inflammatory foci number was associated with partial prevention of the recruitment of inflammatory macrophages (F4/80⁺ CD11b^{high} cells) and neutrophils (Ly6G⁺ Ly6C⁻ cells) into the liver as evaluated by flow cytometric analysis (Figure 3E and F). This was associated with less hepatic expression of *Emr1* (encoding for F4/80) and the adhesion molecule *Sele* (encoding for E-SELECTIN) involved in neutrophil recruitment into the liver³⁸ (Figure 3G). In addition, MCDD-fed *Sh3bp2*^{-/-} mice displayed less hepatic inflammation as evaluated by expression of inflammatory markers including *Cd44*, *Tnf*, *Ccl2*, and *Syk* compared with MCDD-fed Wt mice (Figure 3G). This effect of the hepatic inflammation was also confirmed by the decreased hepatic expression of CD44 and SYK at the protein level (Figure 3H) and decreased serum level of CCL2 (Figure 3I). In addition, the hepatic expression of *Trem1*, an important amplifier of TLR4 pathway via SYK activity,^{15,23-25} decreased in MCDD-fed *Sh3bp2*^{-/-} mice compared with MCDD-fed Wt mice (Figure 3G). In line with this, the expression of *Dap12*, the transmembrane adaptor required for TREM1 function, also decreased (Figure 3G). Because hepatic injury and inflammation are key actors in the fibrogenic process, the 3BP2 deficiency also prevented the priming of hepatic fibrosis as evaluated by the expression of *Tgfb1*, *Timp1*, and *Col1a1* (Figure 3G). The protective effect of 3BP2 deficiency on liver complications was also associated with decreased expression of oxidative stress markers *Cyba* (encoding for P22PHOX) and *heme oxygenase-1* (HMOX1) and increased *Ppar-alpha*, the master regulator of beta-oxidation (Figure 3G). Altogether, we show that by regulating hepatic steatosis, inflammation, and liver injury, 3BP2 plays an important role in the onset of MAFLD.

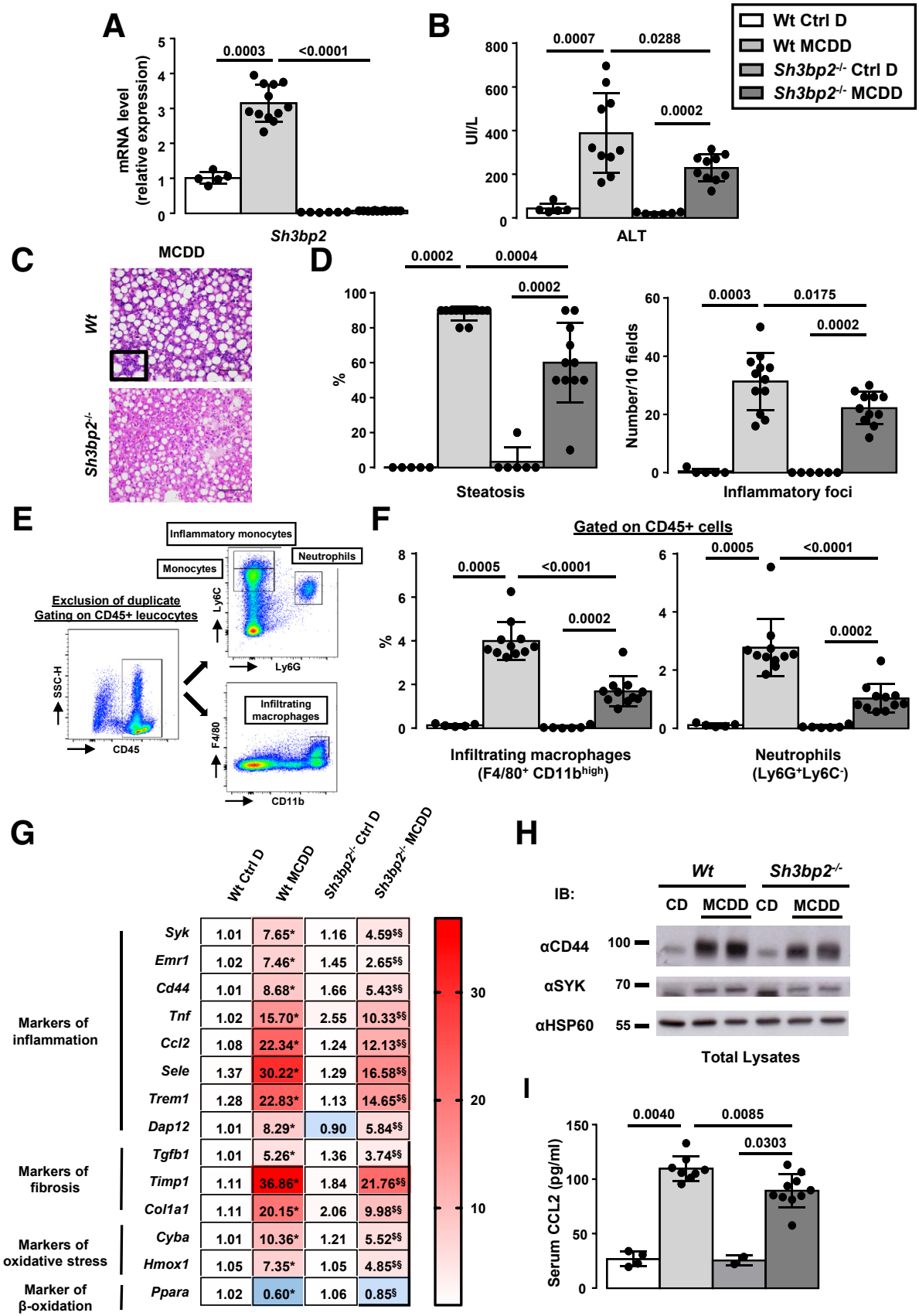
The SYK/3BP2 Axis Significantly Contributed to the Up-Regulation of Inflammatory Mediators in Lipopolysaccharide-Stimulated Hepatocytes

Because hepatocytes are key actors in the early onset of local inflammation, we investigated the role of 3BP2 and SYK in the expression of inflammatory mediators in hepatocytes. Indeed, hepatocytes sense pathogen products such as lipopolysaccharide (LPS) and contribute to the up-regulation of liver cytokines and chemokines leading to the recruitment of inflammatory cells into the liver.⁹ In the steady state, the silencing of *Sh3bp2* strongly decreased the expression of *Syk* in primary mouse hepatocytes. On the other hand, the down-regulation of *Syk* did not impact *Sh3bp2* expression (Figure 4A). In response to LPS, the expression of *Sh3bp2* and *Syk* was up-regulated (LPS vs PBS: *Sh3bp2* = 1.62 ± 0.07, *P* = .0001; *Syk* = 1.54 ± 0.13, *P* = .0074, *n* = 4), and the silencing of *Sh3bp2* prevented LPS-stimulated *Syk* expression (data not shown). In addition, the down-regulation of *Sh3bp2* or *Syk* strongly decreased the up-regulation of inflammatory mediators including *Tnf*, *Ccl2*, *Il1b*, and *Il6* in response to LPS (Figure 4B). In line with this, SYK inhibition by SYK inhibitor R406 (as evaluated by the phosphorylation levels of SYK and ERK) (Figure 4C) strongly prevented the up-regulation of these inflammatory mediators in response to LPS (Figure 4E). Interestingly, R406 treatment also reduced the expression of *Sh3bp2* and *Syk* in the steady state (Figure 4D). These data indicate that 3BP2 regulates SYK expression in challenged hepatocytes and that the SYK/3BP2 axis contributes to the expression of inflammatory mediators in response to PAMPs (LPS).

The Knockdown of SYK in Myeloid Cells Partially Prevented Liver Injury and Inflammation Induced by MCDD Challenge

We investigated the contribution of SYK to the development of the liver complications mediated by MCDD feeding. Because SYK deficiency leads to perinatal lethality in mice^{39,40} and because SYK was preferentially expressed in liver non-parenchymal cells (Figure 2H), we focused on the role of SYK in myeloid cells. The *Syk*^{fl^{ox}/fl^{ox}} *LysM*^{cre/cre} mice (*mSyk*^{KO} mice) displayed a significant decrease in SYK expression in hepatic inflammatory monocytes (Ly6G⁻ Ly6C^{high} cells) and neutrophils (Ly6G⁺ Ly6C⁻ cells) without disruption of the SYK expression in lymphocytes as

Figure 2. (See previous page). Hepatic expression of 3BP2 and SYK correlated with severity of steatohepatitis in mice. Wild-type mice fed control diet (Ctrl D) or MCDD for 2 and 7 weeks (4–8 mice/group). Serum ALT activity (A) and hepatic steatosis (B) and inflammatory foci accumulation (C) (on H&E stained liver tissue section) have been evaluated. (D) Hepatic expression of *Sh3bp2*, *Syk*, and *Emr1* was evaluated at mRNA level. Gene expression was normalized to mRNA levels of $\beta 2m$. Results are expressed relative to expression level in Ctrl D-fed Wt mice for 2 weeks. (E) Correlation between hepatic expression of *Sh3bp2* and *Syk* with hepatic steatosis (%), ALT activity, inflammatory foci number, and hepatic *Emr1* expression were analyzed using Spearman's correlation test. (F) Hepatic expression of *Syk-b* (S) and *Syk* (L) was evaluated at mRNA level in Wt mice fed Ctrl D or MCDD mice for 7 weeks. Gene expression was normalized to $\beta 2m$ mRNA levels and expressed relative to *Syk-b* (S) level in Ctrl D-fed Wt mice. (G) Hepatic expression of SYK and HSP60 was evaluated at the protein level in mice fed control diet (Ctrl D) or MCDD for 7 weeks (2–4 mice/group). (H) Primary hepatocytes and non-parenchymal cells were isolated from lean mice (*n* = 5). *Sh3bp2* and *Syk* mRNA expression levels were analyzed. Gene expression values were normalized to $\beta 2m$ mRNA and expressed relative to *Syk* mRNA levels in hepatocytes. (A–D, F, and H) Results are expressed as means ± SD and statistically analyzed using the Mann-Whitney test. ***P* < .01 versus control.



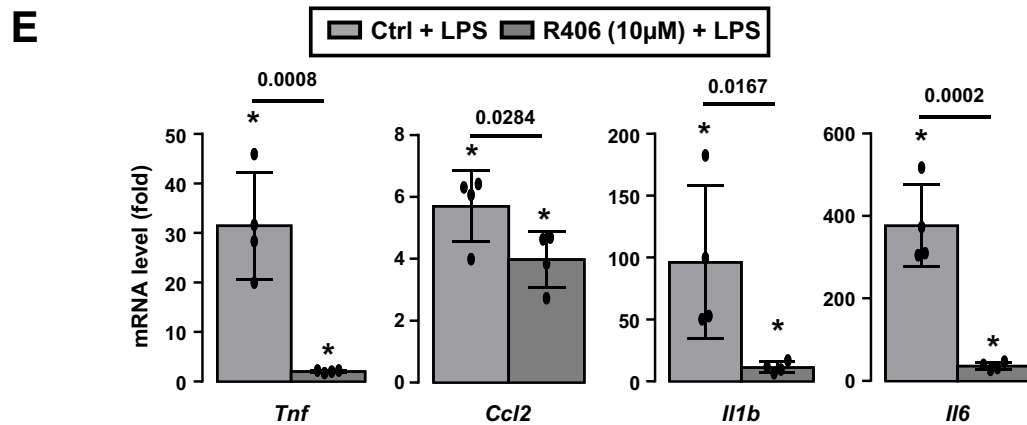
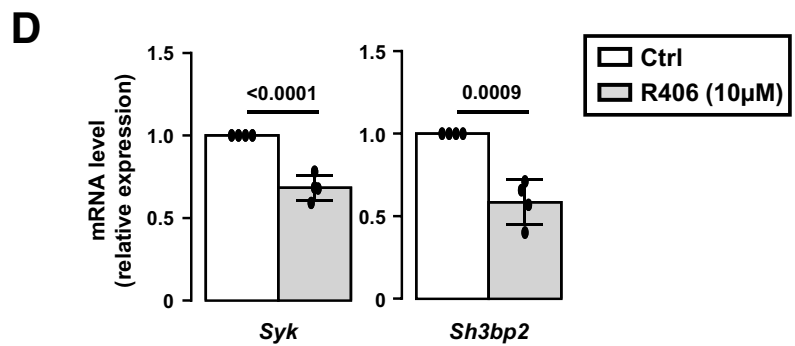
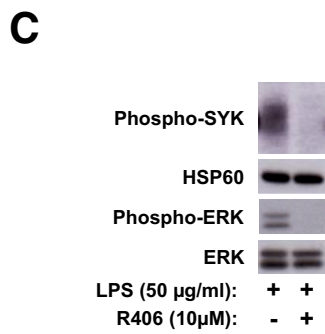
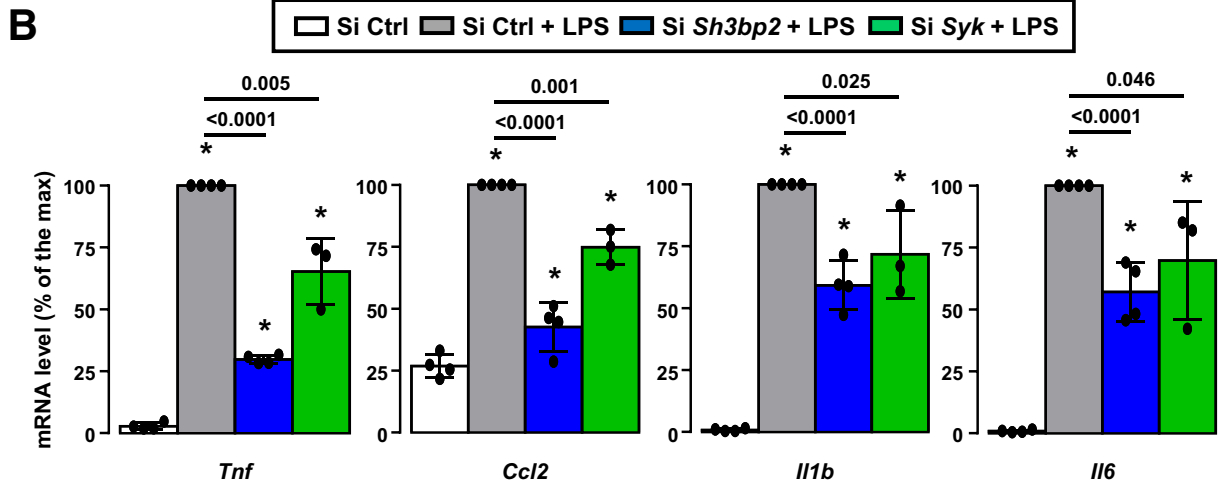
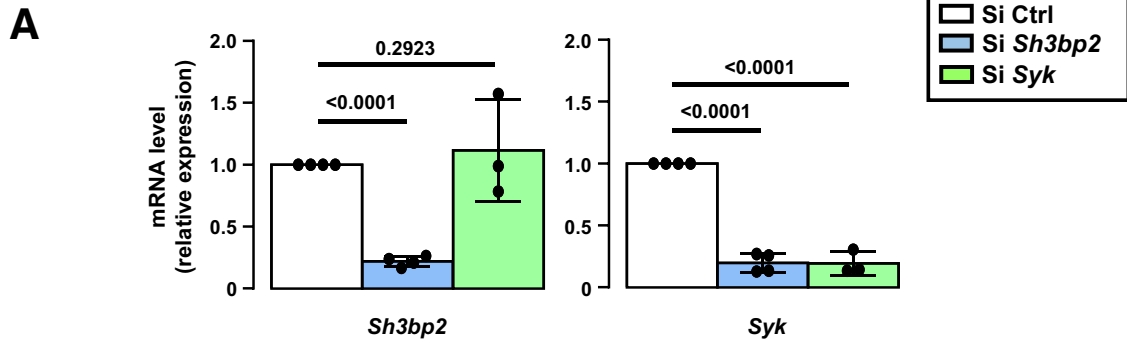
evaluated by flow cytometric analysis (Figure 5A). After 4 weeks of MCDD feeding, the *mSyk*^{KO} mice displayed lower hepatic expression of *Syk* than MCDD-fed Wt mice (Figures 5B and H at the gene and protein levels, respectively) without impacting the *sh3bp2* expression level (Figure 5G). In addition, the MCDD-fed *mSyk*^{KO} mice exhibited less liver damage, as shown by the lower ALT levels (Figure 5C). Furthermore, histologic analyses showed less accumulation of inflammatory foci in the livers of MCDD-fed *mSyk*^{KO} mice compared with livers of MCDD-fed Wt mice without changing in hepatic steatosis (Figure 5D and E). The down-regulation of SYK in myeloid cells strongly prevented the recruitment of infiltrating neutrophils (Ly6G⁺ Ly6C⁻ cells) and macrophages (F4/80⁺ CD11b^{high} cells) into the liver (Figure 5F). Moreover, these were associated with reduced hepatic expression of inflammatory markers such as *Cd44* (Figure 5G and H at the gene and protein levels, respectively) and *Sele* (E-Selectin) (Figure 5G). In line with the potential role of SYK in the regulation of macrophage activation/polarization,^{18,41} the hepatic expression of M1 markers *Itgax* (CD11C) and *Tnf* decreased, whereas the expression of the M2 marker *Clec10a* (CD301) did not change in MCDD-fed *mSyk*^{KO} mice compared with MCDD-fed Wt mice (Figure 5G). As reported for 3BP2 deficiency (Figure 3G), the knockdown of SYK in myeloid cells strongly decreased the hepatic expression of *Trem1* and *Dap12*, the priming of the fibrosis (*Tgfb1* and *Timp1*), and oxidative stress (*Cyba* and *Hmox1*) (Figure 5G). This effect of the inflammation was also confirmed by the decreased serum level of CCL2 (Figure 5I). These results indicate that the conditional ablation of SYK in myeloid cells is sufficient to reduce liver inflammation, injury, and, in turn, the priming of fibrosis in MCDD mice.

SYK Deletion in Myeloid Cells Prevented Severe Hepatitis and Fibrosis in Homozygous *Sh3bp2*^{KI/KI} Mice

To further demonstrate the key role of the SYK/3BP2 pathway in the development of chronic liver diseases, we revisited this pathway in the livers of cherubic mice. Cherubism is an autoinflammatory autosomal dominant bone dysplasia associated with point-mutations of the

Sh3bp2 gene leading to the accumulation of proteasome-resistant mutant 3BP2. The accumulation of 3BP2 mutant proteins exacerbated activities of intracellular signaling components including SYK in myeloid cells.^{31,35,42–44} We evaluated the liver status in homozygous cherubic animals (*Sh3bp2* G418R knock-in mice [*Sh3bp2*^{KI/KI} mice], equivalent to the G420R mutation in cherubism patients), which developed systemic inflammation without regression of the lesions with age.³³ The 14-week-old *Sh3bp2*^{KI/KI} mice already displayed cherubic manifestation (kyphosis) and facial inflammation (closed eyes) (Figure 6A and B) in addition to elevated liver weight relative to body weight (Figure 6C) and aspartate aminotransferase (AST) to ALT ratio (Figure 6D). We also found that the *Sh3bp2*^{KI/KI} mice developed severe hepatitis, as evaluated by the accumulation of large inflammatory foci in the livers without hepatic steatosis (Figure 6E and F). The SYK deletion in myeloid cells in cherubic mice (*mSyk*^{KO}*Sh3bp2*^{KI/KI} mice) prevented all these clinical and biological abnormalities at the early and late age (mean age, 16- versus 43-week-old mice) (Figure 6A–D, data not shown). Interestingly, the SYK deletion in myeloid cells in *Sh3bp2*^{KI/KI} mice decreased the hepatic expression of SYK at the mRNA and protein levels (Figure 6G and H). The SYK deletion in myeloid cells in *Sh3bp2*^{KI/KI} mice also prevented hepatic inflammatory foci accumulation even in old mice (Figure 6E and F). This was also associated with lower hepatic expression of macrophage marker *Emr1* and inflammatory markers including *Cd44*, *Tnf*, *Ccl2*, *Trem1*, and *Dap12* (Figure 6G). This effect of inflammation was also confirmed by the decreased hepatic expression of CD44 at the protein level (Figure 6H) and decreased serum level of CCL2 (Figure 6I). In addition to the prevention of liver inflammation, SYK deficiency in myeloid cells was also associated with the prevention of hepatic fibrosis as evaluated by collagen staining (picosirius red stain, Figure 6E) and lower gene expression of fibrosis markers like *Tgfb1*, *Timp1*, and *Col1a1* (Figure 6G). Finally, the hepatic expression of *Sh3bp2* and *Syk* correlated with liver inflammation and fibrosis (Figure 6G). Altogether, we reported that the sustained activation of 3BP2-SYK pathway mediated by 3BP2 G418R mutant is thus associated with the development of significant fibrotic-hepatitis.

Figure 3. (See previous page). 3BP2 deficiency partially prevented liver injury and steatohepatitis induced by MCDD challenge. Wt and *Sh3bp2*^{-/-} mice fed control diet (Ctrl D) or MCDD for 4 weeks (5–12 mice/group). (A) Hepatic *Sh3bp2* expression was evaluated in Wt Ctrl D and MCDD mice at mRNA level. (B) Serum levels of ALT were evaluated. (C and D) H&E staining of liver tissue sections samples from Wt and *Sh3bp2*^{-/-} after MCDD as indicated. Representative images (C) and quantification of hepatic steatosis and inflammatory foci (D) are shown. (E and F) Hepatic non-parenchymal cells were stained for CD45, F4/80, CD11b, Ly6G, and Ly6C and analyzed by flow cytometry (5–11 mice/group). (E) Details regarding the gating strategy for assessment of infiltrating macrophages (F4/80⁺ CD11b^{high} cells) and neutrophils (Ly6G⁺ Ly6C⁻ cells) into the liver as evaluated by flow cytometric analysis. (F) Results are expressed as means ± SD and statistically analyzed using the Mann-Whitney test. (G) Hepatic mRNA expression levels of *Syk* and markers of inflammation, fibrosis, oxidative stress, and beta-oxidation were analyzed by real-time quantitative PCR (5–12 mice/group). Data are presented as relative mRNA levels normalized to *B2m* mRNA levels. Data are expressed as means in heat map and statistically analyzed using Mann-Whitney test. **P* < .05, compared with Wt Ctrl D mice. [§]*P* < .05, compared with *Sh3bp2*^{-/-} Ctrl D mice, [§]*P* < .05, compared with Wt MCDD mice. (H) Hepatic expression of CD44, SYK, and HSP60 was evaluated at the protein level in Wt and *Sh3bp2*^{-/-} mice fed control diet (Ctrl D) or MCDD for 4 weeks (1–2 mice/group). (I) Serum levels of CCL2 were evaluated (2–10 mice/group). (A, B, D, F, and I) Results are expressed as means ± SD and statistically analyzed using Mann-Whitney test.



Hepatic Expression of SYK Increased With Metabolic Steatohepatitis in Obese Patients

We examined the relationship between hepatic 3BP2 and SYK expression with MAFLD in human liver biopsies from morbidly obese patients who had undergone bariatric surgery. Patients were classified into 3 groups: without MAFLD, with hepatic steatosis, and with metabolic steatohepatitis and severe steatosis (assessed on the basis of histopathological features; Table 1). Liver mRNA levels of *SH3BP2* did not change with obesity and MAFLD (data not shown). By contrast, liver mRNA levels of *SYK* were strongly up-regulated with metabolic steatohepatitis (Figure 7A). This expression correlated with nonalcoholic fatty liver disease activity score, ALT activity, and hepatic expression of macrophage marker *CD68* (Figure 7B). Consistent with our animal studies, the hepatic expression of SYK could be a local marker of hepatic inflammation in MAFLD patients.

Discussion

Here we report that hepatic SYK and 3BP2 contribute to the onset of hepatic inflammation by acting on both parenchymal and myeloid cells. In concert with liver macrophages, the SYK/3BP2 axis in hepatocytes could initiate the local inflammation and contribute to the significant accumulation of bone marrow-derived macrophages and neutrophils in the liver, a hallmark of metabolic steatohepatitis and severe hepatitis. Indeed, SYK/3BP2 regulates the LPS-TLR4 pathway in both hepatocytes and macrophages. The genetic deletion of 3BP2 or SYK in a context of metabolic steatohepatitis or deletion of SYK in myeloid cells in a context of a pro-inflammatory 3BP2 mutation significantly reduced liver inflammation, injury, and fibrosis (priming and/or collagen deposition). We also report that hepatic SYK is a marker of liver inflammation and correlates with hepatic macrophage recruitment in mouse and human metabolic steatohepatitis. We also provide evidence that an important mechanism by which 3BP2 participates to metabolic steatohepatitis is the regulation of the expression of its signaling partner SYK, leading to exacerbated SYK-mediated inflammatory pathway in liver. Together, these data provide novel evidence that targeting the SYK/3BP2 axis is a potential therapeutic approach in chronic liver diseases.

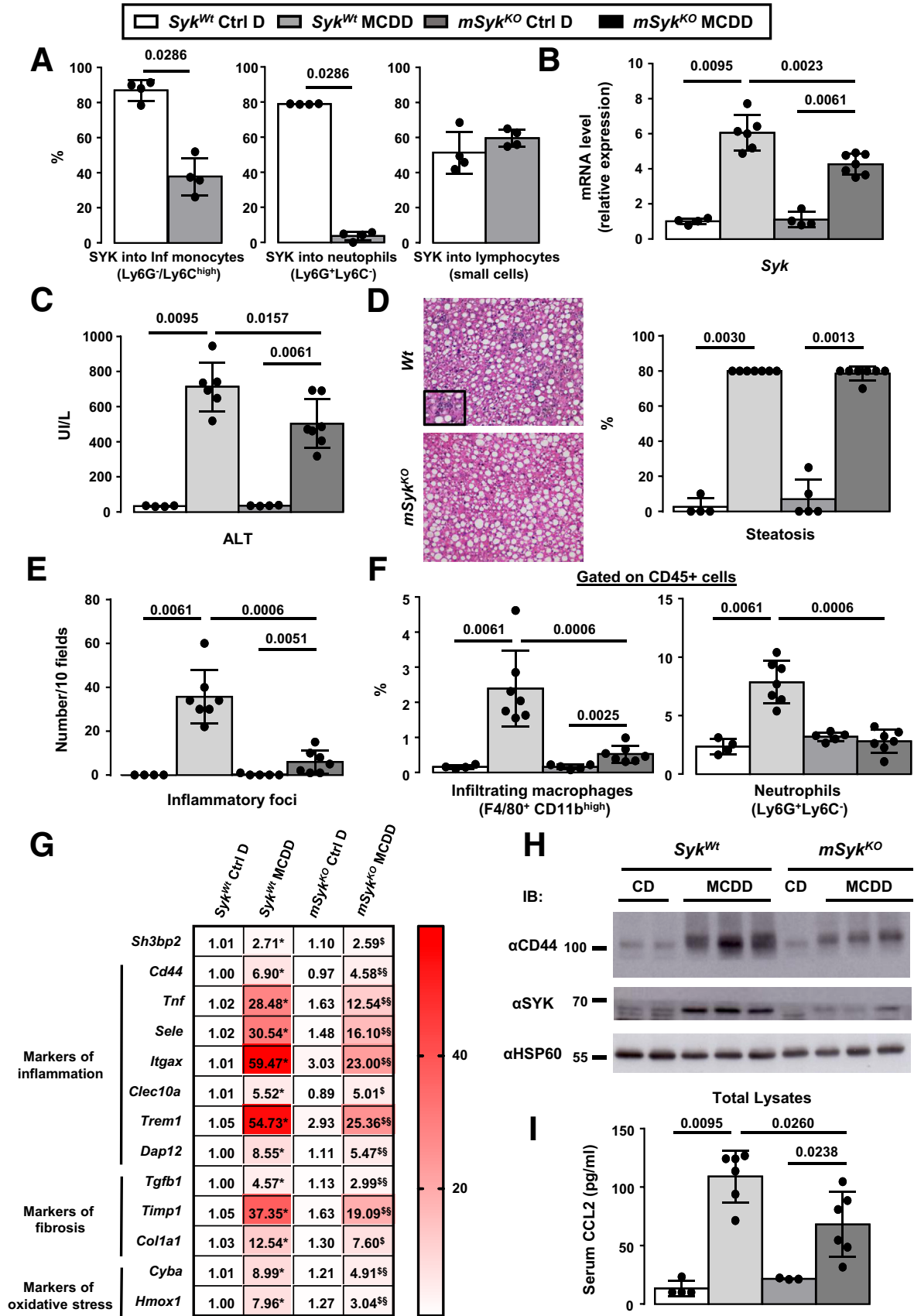
We first show that the SYK/3BP2 pathway in liver parenchymal cells plays an important role in the expression of inflammatory mediators in response to LPS. Remarkably,

3BP2 targeting lowers SYK expression and decreases the expression of tumor necrosis factor (TNF) α , CCL2, interleukin 1 β , and interleukin 6 in response to LPS (Figure 4). Although SYK inhibition slightly decreases the expression of 3BP2, the targeting of SYK (silencing or inhibition) also significantly prevents the up-regulation of these inflammatory mediators upon LPS stimulation (Figure 4). In addition to its detoxifying and metabolic roles, hepatocytes also sense pathogens including bacteria products (for example, LPS) via their membrane and cytoplasmic pattern recognition receptors.¹⁰ Importantly, it has been reported that deficiency or down-regulation of TLR4 in hepatocytes resolved the hepatic inflammation mediated by HFD and associated with decreased insulin resistance, oxidative stress, and hepatic steatosis.^{45,46} These studies support the notion that TLR4 signaling in liver parenchymal cells plays a pivotal role during the early stage of MAFLD by initiating local inflammation. Our results emphasize the importance of the hepatocyte SYK/3BP2 signaling pathway to control the LPS/TLR4-mediated responses.

Among the inflammatory mediators, hepatocytes are a source of the chemokine CCL2, whose expression is modulated by the SYK/3BP2 pathway (Figure 4). The CCL2/CCR2 pair is a key player in the recruitment of inflammatory monocytes into the injured liver and drives hepatic fibrosis.^{47,48} To illustrate this, it has been reported that pharmacologic inhibition of CCL2 or CCR2 in murine models of MAFLD and chronic liver injury (chronic CCl4 treatment) reduced monocyte recruitment into the liver and ameliorated liver inflammation, injury, and fibrosis.^{49,50} Previous studies, including our own, have also reported that hepatic expression of CCL2 was up-regulated in metabolic steatohepatitis patients.^{9,51} Therapeutic treatments with a dual antagonist of chemokine receptors CCR2/CCR5 are currently under clinical investigation for patients with fibrotic metabolic steatohepatitis.⁹

This indicates that regulation of the influx of bone marrow-derived monocytes into the liver is an important event in the onset of liver inflammation and MAFLD progression.^{9,49,52} In addition to therapeutic chemokine targeting, we show here that global deficiency of 3BP2 and SYK deletion in myeloid cells both prevent the recruitment of macrophages and neutrophils into the liver associated with reduced hepatic expression of CCL2 but also CD44 and E-selectin (Figures 3 and 5). CD44 and E-selectin (CD62E) are also important drivers of leukocyte recruitment into the inflamed liver,⁹ and we have previously demonstrated that

Figure 4. (See previous page). 3BP2/SYK pathway contributed to expression of inflammatory mediators in LPS-stimulated hepatocytes. (A and B) Primary mouse hepatocytes were transfected with Si Ctrl (n = 4), Si Sh3bp2 (n = 4), or Si Syk (n = 3) for 48 hours as indicated. Cells were then incubated with medium supplemented with 0.5% bovine serum albumin for 1 hour and treated with LPS (50 μ g/mL) or phosphate-buffered saline for 6 hours. (C) Primary mouse hepatocytes were incubated overnight with medium supplemented with 0.5% bovine serum albumin and then successively treated with R406 (10 μ mol/L) for 2 hours and LPS (50 μ g/mL) for 5 minutes (representative immunoblots are shown). (D and E) Primary mouse hepatocytes were incubated with medium supplemented with 0.5% bovine serum albumin without or with R406 (10 μ mol/L) for 1 hour and then treated with LPS (50 μ g/mL) or phosphate-buffered saline for 6 hours. (A, B, D, and E) *Sh3bp2*, *Syk*, *Tnf*, *Ccl2*, *Il1b*, and *Il6* mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR as indicated. Gene expression values were normalized to *Rplp0* mRNA levels. Results are expressed as means \pm SD. Data were statistically analyzed using Student *t* test. **P* < .05 versus Si Ctrl or Ctrl.



their hepatic expression was strongly up-regulated in metabolic steatohepatitis patients.^{51,53} From our experimental data, we also found that CD44, which interacts with extracellular matrix components including E-selectin, regulates the recruitment of macrophages and neutrophils into the liver. CD44 also regulates the macrophage activation mediated by TLR4 ligands including DAMPs, LPS, and saturated fatty acids in a context of steatohepatitis.⁵³ This pro-inflammatory polarization of resident and recruited liver myeloid cells can also be dependent on the SYK/3BP2 pathway. Indeed, we have recently reported that 3BP2 is necessary for LPS-induced activation of signaling pathways in macrophages.^{27–29,31} In addition, it has been shown that SYK inhibition prevents the pro-inflammatory polarization of macrophages.⁴¹ An important additional amplifier of TLR4-mediated hepatic inflammation is the TREM1/DAP12 pathway.^{23–25} Interestingly, we here report that the prevention of liver inflammation and injury mediated by the targeting of 3BP2 or SYK strongly decrease TREM1/DAP12 expression. Because of the central place of the SYK pathway in both TLR4 and TREM-1 signaling,²³ this suggests the establishment of an inflammatory loop in which SYK and its partner 3BP2 exacerbate liver inflammation.

The chronicity of liver inflammation is also an important driver of the progression of liver complications such as liver injury and fibrosis. From our different mouse models, the down-regulation of 3BP2 or SYK in myeloid cells reduces both liver injury and fibrosis (fibrosis priming and/or collagen accumulation) along with significant decrease in hepatic inflammation (Figures 3, 5, and 6). In line with these results, SYK deletion in the myeloid compartment confers protection against fibrogenic progression upon TAA-mediated liver injury.¹⁸ Of the mechanisms related to liver injury, TNF- α and sustained oxidative stress are reported to mediate hepatocyte death in chronic liver and inflammatory diseases.^{51,54,55} Interestingly, 3BP2 and SYK mutant mice display a reduction in liver expression of TNF- α and markers of oxidative stress (P22phox and Ho-1), coupled with reduced liver injury (Figures 3 and 5). In addition to promoting liver inflammation and associated injury, the SYK pathway can also directly regulate the activity of the HSC. Indeed, it has been shown that SYK inhibitors prevented HSC activation *in vitro* and in animal models of hepatic fibrosis.^{17,18} However, the protective effects of SYK targeting seem to be more related to an effect on myeloid cells than

on HSC because its deficiency in HSC (Lrat^{Cre}Syk^{flox/flox}) did not mitigate the severity of fibrosis mediated by TAA treatment.¹⁸

Interestingly, we also show that SYK deletion in myeloid cells prevents hepatic inflammation in cherubic mice expressing the 3BP2 G418R mutant (Sh3bp2 G418R knock-in mice, equivalent to the G420R mutation in cherubism patients). Indeed, SYK deletion in these mice mediates a drastic reduction in inflammatory foci number, macrophage recruitment, and hepatic expression of TNF- α , CCL2, and CD44. These protective mechanisms were also associated with restoration of hepatic 3BP2 and SYK expression to normal in Sh3bp2 G418R knock-in mice (Figure 6). Interestingly, both the protective effects of SYK deletion in the accumulation of inflammatory foci and the up-regulation of hepatic TNF- α expression have been recently reported in another mouse model of cherubic mice (Sh3bp2 P416R knock-in mice).³⁶ We further show in our Sh3bp2 G418R knock-in mice that the selective knockdown of SYK in myeloid cells is also sufficient to prevent the development of liver fibrosis with the quasi-absence of collagen deposition and changes to TGF β , TIMP1, and COL1 α 1 expression (Figure 6). Because the SYK inhibitor treatment in cherubic mice reduces systemic and hepatic inflammation,³⁷ the inhibition of SYK activity could also ameliorate liver fibrosis in mouse cherubism.

We also report that the 3BP2 deficiency reduces liver steatosis upon MCDD challenge (Figure 3). Although additional studies to better understand the role of 3BP2 in hepatocyte metabolism and steatosis development are needed, the 3BP2 deficiency is associated with the prevention of decreased peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α) upon MCDD challenge (Figure 3G). It is well-established that PPAR α plays a key role in the regulation of hepatocyte metabolism including fatty acid uptake, beta-oxidation, and triglyceride turnover.⁵⁶ Mice with genetic deletion of PPAR α fed MCDD developed more severe steatosis and necroinflammation compared with Wt mice. To the contrary, treatment with PPAR α agonist Wy-14643 can prevent and reverse MCDD-induced hepatic steatosis, inflammation, and liver injury in a PPAR α -dependent manner, likely via increased fatty acid oxidation.^{57,58} Interestingly, the treatment of primary hepatocytes with the SYK inhibitor R406 also enhances PPAR α and PGC1 α expression (Ppara: $\times 1.8 \pm 0.2$, $P = .029$; Pgc1a: $\times 4.6 \pm 1.0$, $P = .013$,

Figure 5. (See previous page). SYK deletion in myeloid cells partially prevented liver injury and inflammation induced by MCDD challenge. Wild-type (Syk^{Wt}) and Syk^{flox/flox} LysM^{cre/cre} (*mSyk*^{KO}) mice fed control diet (Ctrl D) or MCDD for 4 weeks (4–7 mice/group). (A) Evaluation of SYK expression in hepatic inflammatory monocytes (Ly6G⁻ Ly6C^{high} cells), neutrophils (Ly6G⁺ Ly6C⁻ cells), and lymphocytes (small cells) by flow cytometric analysis (4 mice/group). (B and G) Hepatic mRNA expression levels of Syk, Sh3bp2, and markers of inflammation, fibrosis, and oxidative stress were analyzed by real-time quantitative PCR (4–7 mice/group). Data are presented as relative mRNA levels normalized to $\beta 2m$ mRNA levels. Data are expressed as means \pm SD (B) or as means in heat map (G) and statistically analyzed using Mann-Whitney test. * $P < .05$, compared with Syk^{Wt} Ctrl D mice. $^{\$}P < .05$, compared with *mSyk*^{KO} Ctrl D mice. $^{\$}P < .05$, compared with Syk^{Wt} MCDD mice. (C) Serum levels of ALT were evaluated. (D) H&E staining of liver tissue sections from Syk^{Wt} and *mSyk*^{KO} after MCDD as indicated. Representative pictures and quantification of hepatic steatosis are shown. (E) Quantification of inflammatory foci. (F) Liver non-parenchymal cells were stained for CD45, F4/80, CD11b, Ly6G, and Ly6C and analyzed by flow cytometry (4–7 mice/group). (H) Hepatic expression of CD44, SYK, and HSP60 was evaluated at the protein level in Syk^{Wt} and *mSyk*^{KO} mice fed control diet (Ctrl D) or MCDD for 4 weeks (1–3 mice/group). (I) Serum levels of CCL2 were evaluated (3–6 mice/group). (A–F and I) Results are expressed as means \pm SD and statistically analyzed using Mann-Whitney test.

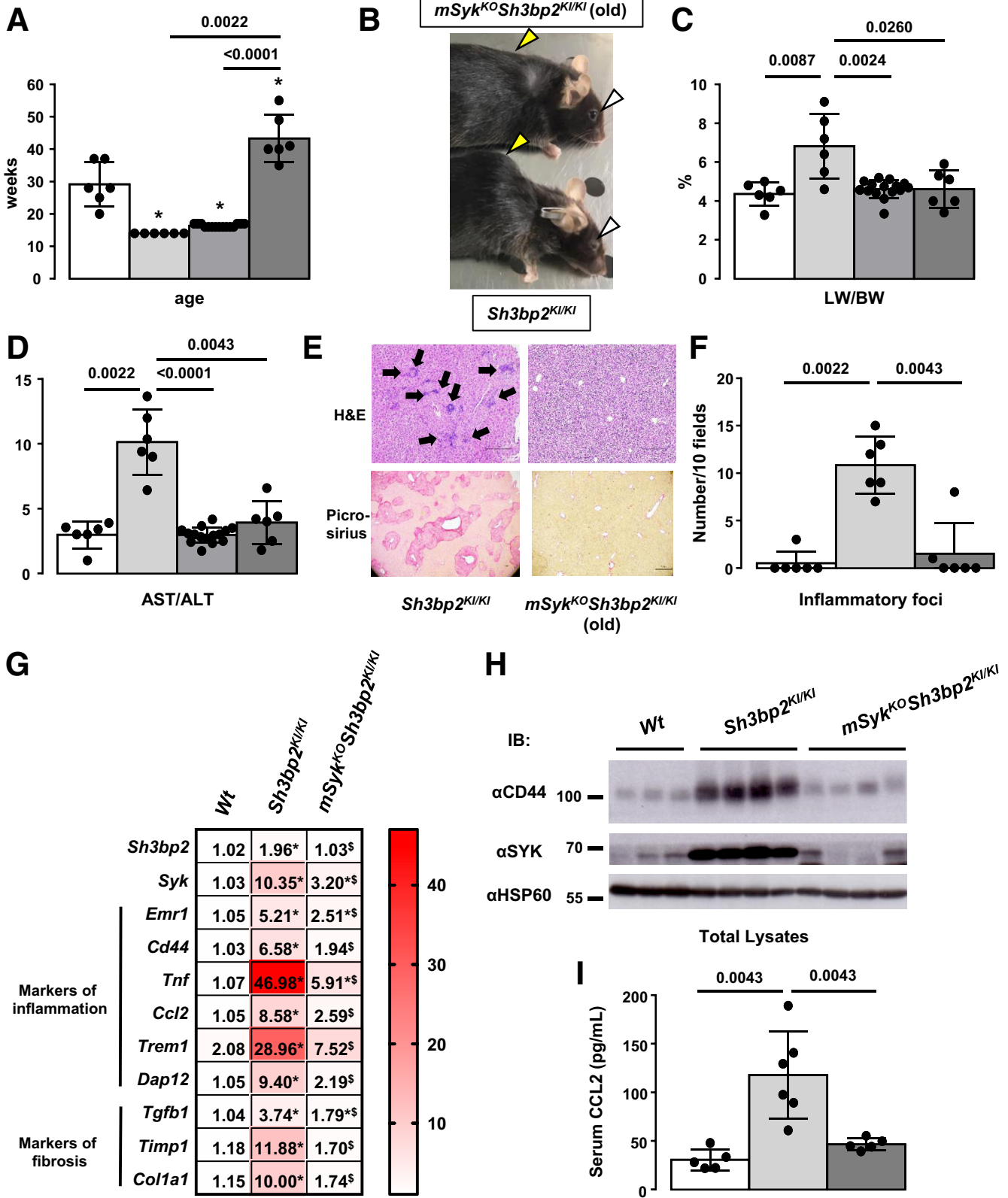
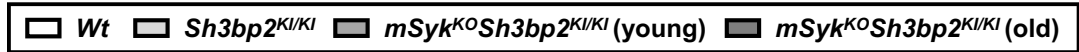


Table 1. Characteristics of the Obese Patients

	Without MAFLD	Steatosis	NASH
n	6	16	11
Age (y)	37.8 ± 12.7	36.6 ± 9.2	42.5 ± 10.3
BMI (kg/m ²)	42.9 ± 1.1	43.2 ± 4.4	44.6 ± 6.1
ALT (IU/L)	14.0 ± 3.6	31.8 ± 10.9 ^a	94.6 ± 78.6 ^{a,b}
AST (IU/L)	18.1 ± 4.3	23.4 ± 5.4 ^a	59.1 ± 43.1 ^{a,b}
Fasting insulin (mIU/L)	11.1 ± 7.4	15.7 ± 12.0	39.3 ± 28.5 ^{a,b}
Fasting glucose (mmol/L)	4.8 ± 0.3	5.3 ± 0.5 ^a	7.9 ± 4.5 ^a
HOMA-IR	2.3 ± 1.3	3.8 ± 3.0	13.3 ± 10.8 ^{a,b}
Hemoglobin A1c (%)	5.2 ± 0.4	5.6 ± 0.4	6.8 ± 1.7 ^{a,b}
NAFLD activity score (n)	0 (6)	1 (1) 2 (5) 3 (10)	5 (11)
Grade of steatosis (n)	0 (6)	1 (1) 2 (6) 3 (9)	3 (11)
Lobular inflammation (n)	0 (6)	0 (15) 1 (1)	1 (11)
Hepatocellular ballooning (n)	0 (6)	0 (16)	1 (11)

NOTE. Without MAFLD: patients with normal liver histology; Steatosis: patients with steatosis; NASH: patients with severe steatosis and nonalcoholic steatohepatitis. Data are expressed as mean ± SD and compared using the non-parametric Mann-Whitney test.

BMI, body mass index; HOMA-IR, homeostatic model assessment for insulin resistance.

^a*P* < .05 compared with “Without MAFLD”.

^b*P* < .05 compared with “Steatosis”.

n = 4). Altogether, this suggests that SYK and its signaling partner 3BP2 could also be important regulators of hepatocyte metabolism and liver steatosis development.

Finally, we find that the hepatic expression of SYK is up-regulated with metabolic steatohepatitis and correlates with the presence of liver macrophage in obese patients (Figure 7). This is not dependent on hepatic fibrosis because our patients with liver biopsy-proven steatosis or metabolic steatohepatitis have only minimal scarring (F1: portal fibrosis without septa). Interestingly, different groups recently reported an association between the hepatic levels of SYK and liver fibrosis/cirrhosis in patients with hepatitis B virus infection, hepatitis C virus infection, alcohol abuse, cholestasis, and metabolic steatohepatitis.^{17,41,59} Altogether, these results could indicate that liver SYK expression is a relevant new biomarker for metabolic steatohepatitis and its progression to cirrhosis.

In summary, the harmful functions of the SYK/3BP2 signaling pathway in chronic liver diseases occur at different stages of the disease (from steatosis to fibrosis)

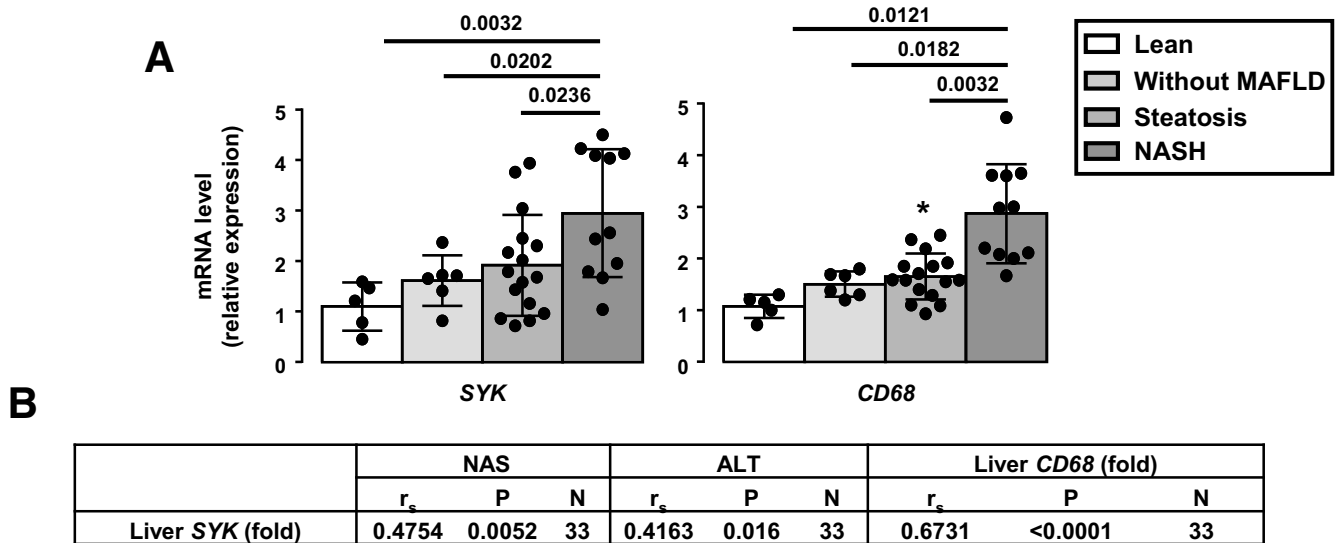
and in different liver cells (hepatocytes, macrophages, HSC, etc). In the early stages by enhancing LPS-TLR4 responses in hepatocytes and resident macrophages, the SYK/3BP2 pathway could initiate the onset of local inflammation and the up-regulation of factors involved in the recruitment of monocytes and neutrophils into the liver. The increase in pro-inflammatory polarization of recruited macrophages by SYK and 3BP2 could fuel a feed-forward mechanism whereby the amplified local inflammation subsequently contributes to liver injury and fibrosis. Inhibition of the SYK/3BP2 pathway in both hepatocytes and liver non-parenchymal cells (macrophages and HSCs) could represent a new therapeutic strategy to dampen inflammation, cell death, and disease progression in chronic liver diseases.

Materials and Methods

Animals and Study Design

Transgenic mice. Mice had a C57BL/6 background. *Sh3bp2*^{-/-} (*Sh3bp2*^{KO}) mice have previously been

Figure 6. (See previous page). SYK deletion in myeloid cells prevented severe hepatitis in homozygous *Sh3bp2*^{KI/KI} mice. Wild-type (mean age = 29 weeks, *n* = 6, 16% of male), *Sh3bp2*^{KI/KI} (mean age = 14 weeks, *n* = 6, 33% of male), young *mSyk*^{KO} *Sh3bp2*^{KI/KI} (mean age = 16 weeks, *n* = 15, 58% of male), and old *mSyk*^{KO} *Sh3bp2*^{KI/KI} (mean age = 43 weeks, *n* = 6, 50% of male) mice were characterized. (A) Age of the mice. (B) Facial appearance (white arrows) (open eyelids reflect lack of facial inflammation) and kyphosis (yellow arrows) of 14-week-old *Sh3bp2*^{KI/KI} mice and 41-week-old *mSyk*^{KO} *Sh3bp2*^{KI/KI} mice are shown. (C) Liver to body weight. (D) Serum AST/ALT ratio. (E) H&E and picrosirius red staining of liver samples from *Sh3bp2*^{KI/KI} and old *mSyk*^{KO} *Sh3bp2*^{KI/KI} mice as indicated. Representative pictures are shown. (F) Quantification of inflammatory foci. (G) Hepatic mRNA expression levels of *Syk*, *Sh3bp2*, and markers of inflammation (*Emr1*, *Cd44*, *Tnf*, *Ccl2*, *Trem1*, *Dap12*) and fibrosis (*Tgfb1*, *Timp1*, and *Col1a1*) were analyzed by real-time quantitative PCR (6 mice/group). Data are presented as relative mRNA levels normalized to $\beta 2m$ mRNA levels. Data are expressed as means in heat map and statistically analyzed using Mann-Whitney test. **P* < .05, compared with Wt mice. [§]*P* < .05, compared with *Sh3bp2*^{KI/KI} mice. (H) Hepatic expression of CD44, SYK, and HSP60 was evaluated at the protein level in Wt, *Sh3bp2*^{KI/KI}, and old *mSyk*^{KO} *Sh3bp2*^{KI/KI}. (F) Serum levels of CCL2 were evaluated (5–6 mice/group). (A, C, D, F, and I) Results are expressed as means ± SD and statistically analyzed using Mann-Whitney test.



Spearman's rank correlation test.

Figure 7. Hepatic SYK expression increased with metabolic steatohepatitis in obese patients. (A) Liver SYK and CD68 mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR in lean patients (n = 5), in severely obese patients without MAFLD (n = 6), with hepatic steatosis (n = 16), and with severe hepatic steatosis and metabolic steatohepatitis (n = 11). Gene expression values were normalized to *RPLP0* mRNA levels. Results are expressed relative to expression level in lean subjects (means \pm SD) and statistically analyzed using Mann-Whitney test. (B) Correlation between hepatic SYK expression (fold change) with nonalcoholic fatty liver disease activity score (NAS), ALT activity, and hepatic expression of CD68 (fold change) were analyzed using Spearman's correlation test. NASH, nonalcoholic steatohepatitis.

described.⁶⁰ *Sh3bp2*^{KI/KI} ³¹ were generated by the Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France, <http://www-mci.u-strasbg.fr>) by knocking-in a GGA-to-CGA mutation in the *Sh3bp2* exon 9, resulting in a Gly418-to-Arg substitution in 3BP2 protein, as previously described.³¹ *LysM*^{cre/cre} (B6.129P2-Lyz2^{tm1(cre)lfo}/J) mice were provided by the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). The *Syk* conditional knockout mouse (*Syk* cKO) model was generated by the Institut Clinique de la Souris (internal reference IR00002283/K504) by floxing exon 2 (containing the ATG starting site) and exon 3 of the *Syk* locus. Myeloid *Syk* conditional mutant mice (*mSyk*^{KO}) were obtained by crossing the *Syk* cKO strain with the *LysM*^{cre/cre} transgenic mice

HFD. Seven-week-old Wt mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were acclimated to our animal facilities under a 12-hour/12-hour light/dark cycle at a temperature of 21°C \pm 2°C and were fed ad libitum either a HFD (45% fat D12451; Research Diet, New Brunswick, NJ) or control diet (Ctrl D) for 33 weeks.

MCDD. Averaging 19-week-old male Wt, *Sh3bp2*^{KO} and *Syk*^{Flox/Flox}*LysM*^{cre/cre} (*mSyk*^{KO}) C57BL/6 male mice were acclimated to our animal facilities under 12-hour/12-hour light/dark cycle at a temperature of 21°C \pm 2°C and were fed ad libitum either MCDD or control diet (Ctrl D) for 2, 4, and 7 weeks as indicated (diets from SSMIFF (MCDD # E15653-94; control diet # E15654-04).

Characterization of *Sh3bp2*^{KI/KI} mice. Wt (mean age, 29 weeks, n = 6, 16% of male), *Sh3bp2*^{KI/KI} (mean age, 14 weeks, n = 6, 33% of male), young *mSyk*^{KO} *Sh3bp2*^{KI/KI}

(mean age, 16 weeks, n = 15, 58% of male), and old *mSyk*^{KO} *Sh3bp2*^{KI/KI} (mean age, 43 weeks, n = 6, 50% of male) were analyzed. At the end of the corresponding challenge, blood was collected, and mice were immediately killed, after which the liver was removed. One part of the liver was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. The second part was fixed in buffered formalin, paraffin-embedded, sectioned, and stained with hematoxylin-eosin and picosirius red as indicated. The remaining part was used for a flow cytometry analysis. The guidelines of laboratory animal care were followed, and the local ethical committee approved the animal experiments (Comité Institutionnel d'Ethique Pour l'Animal de Laboratoire, national agreement no. 28) (NCE/2013-108) (mouse models of MAFLD: APAFIS#5100-2015121110477413 v6) (*Sh3bp2* project: APAFIS#6999-2016110416248139 v3) (*SYK* project: APAFIS#16775-2018090516097783 v2) (Authorization of the C3M animal facility: B06-088-20).

Human Samples

Morbidly obese patients (Nice) (gene expression: n = 33) were recruited through the Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation (Archet 2, University Hospital, Nice, France) where they underwent bariatric surgery for their morbid obesity. Bariatric surgery was indicated for these patients in accordance with French guidelines. Exclusion criteria were presence of hepatitis B or hepatitis C infection, excessive alcohol consumption (>20 g/d), or another cause of chronic liver disease as

previously described.^{53,61,62} The characteristics of the study groups are described in [Table 1](#). Before surgery, fasting blood samples were obtained and used to measure ALT and AST, glucose, insulin, and hemoglobin A1c. Insulin resistance was calculated using the homeostatic model assessment index.⁶³ Surgical liver biopsies were obtained during surgery, and no ischemic preconditioning was performed. Hepatic histopathological analysis was performed according to the scoring system of Kleiner et al.⁶⁴ Three histopathological features were semiquantitatively evaluated: grade of steatosis (0, <5%; 1, 5%–30%; 2, >30%–60%; 3, >60%), lobular inflammation (0, no inflammatory foci; 1, <2 inflammatory foci per ×200 field; 2, 2–4 inflammatory foci per ×200 field; 3, >4 inflammatory foci per ×200 field), and hepatocellular ballooning (0, none; 1, few balloon cells; 2, many cells/prominent ballooning). Nonalcoholic fatty liver disease activity score, which is the unweighted sum of scores of steatosis, lobular inflammation, and hepatocellular ballooning, was used to grade activity. Presence of metabolic steatohepatitis was defined as nonalcoholic fatty liver disease activity score ≥ 5 .

Control Subjects

Liver tissue was obtained from 5 lean subjects (5 women; age, 44 ± 9 years; body mass index, 21 ± 1.9 kg/m²) undergoing partial hepatectomy for benign tumors (neighbor tissues from 4 adenoma and 1 focal nodular hyperplasia; CHU Henri Mondor, Department of Pathology, AP-HP - Université Paris Est Créteil, Créteil, France). Three subjects underwent left lobectomy or bisegmentectomy without ischemic preconditioning, and 2 patients underwent right hepatectomy with potential ischemic preconditioning (no data). Liver samples did not display any hepatic steatosis, inflammation, or fibrosis. All subjects gave their informed written consent to participate in this study in accordance with French legislation regarding Ethics and Human Research (Huriet-Serusclet law). The Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Nice approved the study (07/04:2003, N° 03.017).

Serum Transaminases Assay and CCL2 Levels

Serum transaminases activity (AST/ALT) was determined using an in vitro test with pyridoxal phosphate activation on Roche/Hitachi cobas c systems (ASTPM, ALTPM; cobas, Meylan, France). Roche/Hitachi cobas c systems automatically calculate the concentration of each sample. Serum levels of CCL2 were evaluated with enzyme-linked immunosorbent assay (#DY479; Bio-Techne, Minneapolis, MN), as described in the manufacturer's instructions (dilution to the fifth).

Flow Cytometric Analysis

A fraction of the mouse liver was crushed on a 100 μ m cell strainer and washed with RPMI 1640 medium. The cellular suspension was centrifuged at 630g for 5 minutes at 4°C. The cell pellet was resuspended and centrifuged on a density cushion of Percoll (40% and 70%) at 780g for 20

minutes at room temperature. The non-parenchymal cell fraction between 40% and 70 % Percoll was collected, centrifuged at 630g for 5 minutes at 4°C, and resuspended in phosphate-buffered saline containing 3% fetal bovine serum and 5 mmol/L EDTA. Cell suspensions were incubated with purified anti-FcγRII/III monoclonal antibody blocking antibody before being stained at 4°C for 10 minutes to block Fc receptors. Cells were then stained with fluorochrome-coupled antibodies for 30 minutes at 4°C against CD45 (clone 30F11), F4/80 (clone BM8), CD11b (clone M1/70), Ly6G (clone 1A8), or Ly6C (clone AL21). All antibodies were purchased from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ), eBioscience (San Diego, CA), and Bio Rad ABD Serotec (Oxford, United Kingdom). For intracellular staining, cells were fixed and permeabilized using the BD Cytofix/Cytoperm (Ref 554714) according to the manufacturer's instructions. Samples were first stained for cell surface markers as described above and then for intracellular markers using anti-SYK antibodies (clone D3Z1E XP, PE conjugate; Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Samples were acquired using a fluorescence activated cell sorting (FACS) Canto II flow cytometer, and the data were analyzed using the FACS Diva software version 8.0.1 (BD Biosciences) or FlowJo V10 software (Treestar, Ashland, OR).

Hepatic Parenchymal and Non-parenchymal Cell Isolation

Mouse hepatocytes were isolated with a two-step collagenase procedure. Briefly, mouse livers were perfused with HEPES buffer containing 8 g/L NaCl, 33 mg/L Na₂HPO₄, 200 mg/L KCl, and 2.38 g/L HEPES, pH 7.5, supplemented with 0.5 mmol/L EGTA for 3 minutes at 3 mL/min, then with HEPES buffer for 3 minutes at 3 mL/min, and finally with HEPES buffer supplemented with 1.5 g/L CaCl₂ and 0.026% collagenase type IV (Sigma-Aldrich; C5138, Saint-Quentin-Fallavier, France) for 7 minutes at 3 mL/min. Livers were then carefully removed and minced in Williams' E medium (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific Inc), 100 units/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 2 mmol/L L-glutamine, and 0.02 UI/mL insulin (Umulin; Lilly France, Neuilly-sur-Seine, France). The cell suspension was then filtered (100 μ m), and hepatocytes were pelleted after 2 centrifugations at 50g for 5 minutes. The supernatants were collected at each step, which contained the non-parenchymal cell fraction. Pelleted hepatocytes were resuspended in 39% Percoll solution, centrifuged at 50g for 5 minutes at room temperature, and collected at the bottom of the tube. Viability was evaluated by trypan blue exclusion (Sigma-Aldrich).

Primary Hepatocyte Treatments

Down-regulation of 3BP2 and SYK was achieved using Lipofectamine RNAiMAX technologies (MSS216132, Mouse Sh3bp2; HSS238073, mouse Syk; Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. After 48-hour transfection, cells were incubated with Williams' E medium supplemented with 0.5% bovine serum albumin for

1 hour and then treated with LPS (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 6 hours. For the R406 inhibitor, cells were incubated with (1) Williams' E medium supplemented with 0.5% bovine serum albumin overnight and then successively treated with R406 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) for 2 hours and then LPS (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 5 min as indicated (Western blot analysis) and (2) Williams' E medium supplemented with 0.5% bovine serum albumin without or with R406 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) for 1 hour and then treated with LPS (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 6 hours (gene expression analysis).

Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Analysis

Total liver RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (74104; Qiagen, Hilden, Germany) and treated with Turbo DNA-free DNase (AM 1907, Thermo Fisher Scientific Inc) following the manufacturer's protocol. The quantity and quality of the RNA samples were determined using the Agilent 2100 Bioanalyzer with RNA 6000 Nano Kit (5067-1511; Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Total RNA (1 μg) was reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc). Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed in duplicate for each sample using the StepOne Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc) as previously described.^{53,65,66} TaqMan gene expression assays were purchased from Thermo Fisher Scientific Inc: *RPLP0* (Hs99999902_m1) (Mm99999223_gH); *B2m* (Mm00437762_m1); *Syk* (Mm01333032_m1; Hs00895377_m1); *Sh3bp2* (Mm00449397_m1; Hs00610068_m1); *Syk (L)* (Mm00441647_m1); *Syk (S)* (Mm01333035_m1); *Emr1* (Mm00802529_m1); *Cd44* (Mm01277163_m1); *Tnf* (Mm00443258_m1); *Ccl2* (Mm00441242_m1); *Sele* (Mm01310197_m1); *Itgax* (Mm00498698_m1); *Clec10a* (Mm00546124_m1); *Tgfb1* (Mm03024053_m1); *Timp1* (Mm00441818_m1); *Col1a1* (Mm00801666_g1); *Cyba* (Mm00514478_m1); *Hmox1* (Mm00516005_m1), *CD68* (Hs00154355_m1), *Il6* (Mm00446190_m1), *Il1b* (Mm00434228m1), *Trem1* (Mm01278455_m1), and *Dap12* (Mm00449152_m1). Gene expression was normalized to the $\beta 2m$ ($\beta 2$ microglobulin, mouse) or *RPLP0* (Ribosomal Phosphoprotein Large P0, mouse and human) housekeeping genes and calculated on the basis of the comparative cycle threshold Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Gene expression was normalized to the *RPLP0*/*36b4* housekeeping gene (human and mouse) and calculated on the basis of the comparative cycle threshold Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Immunoblotting

Cells or frozen tissues were solubilized in lysis buffer (20 mmol/L Tris, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaF, 2 mmol/L sodium orthovanadate, 10 mmol/L pyrophosphate, protease inhibitor cocktail, 1% Triton X-100, and okadaic acid) for 45 minutes at 4°C. Lysates were cleared (14,000 rpm, 15 minutes). Proteins were quantified (BCA Protein assay kit, 23225; Thermo Fisher Scientific Inc), separated by sodium dodecyl sulfate-

polyacrylamide gel electrophoresis, and immunoblotted as previously described.⁵³ The proteins were probed with Anti-SYK (#2712; Cell Signaling Technology), Anti-CD44 (AF6127; Bio-Techne), Anti-phospho SYK (Tyr^{525/526}) (#2710; Cell Signaling Technology), Anti-p44/42 MAPK (#4695; Cell Signaling Technology), Anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) (#9101; Cell Signaling Technology), and anti-HSP60 (K-19) (sc-1722; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) antibodies at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Cell Signaling Technology) or at 1/1000 (Santa Cruz Biotechnology) as indicated.

Statistical Analysis

Statistical significance between 2 human or mouse study groups was determined using the non-parametric Mann-Whitney test. Data from cell lines were analyzed using the Student *t* test. Spearman's correlation test was used for the correlative analysis. Results were considered significant for $P < .05$.

References

1. Eslam M, Sanyal AJ, George J, International Consensus P. MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. *Gastroenterology* 2020;158:1999–2014 e1.
2. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73–84.
3. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, Gortmaker SL. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* 2011;378:804–814.
4. Samuel VT, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease as a nexus of metabolic and hepatic diseases. *Cell Metab* 2018;27:22–41.
5. Raff EJ, Kakati D, Bloomer JR, Shoreibah M, Rasheed K, Singal AK. Diabetes mellitus predicts occurrence of cirrhosis and hepatocellular cancer in alcoholic liver and non-alcoholic fatty liver diseases. *J Clin Transl Hepatol* 2015;3:9–16.
6. Lallukka S, Yki-Jarvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2016;30:385–395.
7. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2010;363:1341–1350.
8. Tran A, Gual P. Non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013; 37:17–29.
9. Luci C, Bourinet M, Leclère PS, Anty R, Gual P. Chronic inflammation in non-alcoholic steatohepatitis: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Front Endocrinol* 2020;11:597648.
10. Cai J, Zhang XJ, Li H. The role of innate immune cells in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2019; 70:1026–1037.
11. Kazankov K, Jorgensen SMD, Thomsen KL, Moller HJ, Vilstrup H, George J, Schuppan D, Gronbaek H. The role

- of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16:145–159.
12. Lefere S, Tacke F. Macrophages in obesity and non-alcoholic fatty liver disease: crosstalk with metabolism. *JHEP Rep* 2019;1:30–43.
 13. Mocsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 2010;10:387–402.
 14. Dennehy KM, Ferwerda G, Faro-Trindade I, Pyz E, Willment JA, Taylor PR, Kerrigan A, Tsoni SV, Gordon S, Meyer-Wentrup F, Adema GJ, Kullberg BJ, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mora-Montes HM, Gow NA, Williams DL, Netea MG, Brown GD. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur J Immunol* 2008;38:500–506.
 15. Miller YI, Choi SH, Wiesner P, Bae YS. The SYK side of TLR4: signalling mechanisms in response to LPS and minimally oxidized LDL. *Br J Pharmacol* 2012;167:990–999.
 16. Zewinger S, Reiser J, Jankowski V, Alansary D, Hahn E, Triem S, Klug M, Schunk SJ, Schmit D, Kramann R, Korbel C, Ampofo E, Laschke MW, Selejan SR, Paschen A, Herter T, Schuster S, Silbernagel G, Sester M, Sester U, Assmann G, Bals R, Kostner G, Jahnen-Dechent W, Menger MD, Rohrer L, Marz W, Bohm M, Jankowski J, Kopf M, Latz E, Niemeyer BA, Fliser D, Laufs U, Speer T. Apolipoprotein C3 induces inflammation and organ damage by alternative inflammasome activation. *Nat Immunol* 2020;21:30–41.
 17. Qu C, Zheng D, Li S, Liu Y, Lidofsky A, Holmes JA, Chen J, He L, Wei L, Liao Y, Yuan H, Jin Q, Lin Z, Hu Q, Jiang Y, Tu M, Chen X, Li W, Lin W, Fuchs BC, Chung RT, Hong J. Tyrosine kinase SYK is a potential therapeutic target for liver fibrosis. *Hepatology* 2018;68:1125–1139.
 18. Torres-Hernandez A, Wang W, Nikiforov Y, Tejada K, Torres L, Kalabin A, Wu Y, Haq MIU, Khan MY, Zhao Z, Su W, Camargo J, Hundeyin M, Diskin B, Adam S, Rossi JAK, Kurz E, Aykut B, Shadaloey SAA, Leinwand J, Miller G. Targeting SYK signaling in myeloid cells protects against liver fibrosis and hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2019;38:4512–4526.
 19. Afifiyan N, Tillman B, French BA, Masouminia M, Samadzadeh S, French SW. Over expression of proteins that alter the intracellular signaling pathways in the cytoplasm of the liver cells forming Mallory-Denk bodies. *Exp Mol Pathol* 2017;102:106–114.
 20. Pamuk ON, Can G, Ayzavaz S, Karaca T, Pamuk GE, Demirtas S, Tsokos GC. Spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor fostamatinib limits tissue damage and fibrosis in a bleomycin-induced scleroderma mouse model. *Clin Exp Rheumatol* 2015;33(Suppl 91):S15–S22.
 21. Ma FY, Blease K, Nikolic-Paterson DJ. A role for spleen tyrosine kinase in renal fibrosis in the mouse obstructed kidney. *Life Sci* 2016;146:192–200.
 22. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB, Magilavy DB. An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2010;363:1303–1312.
 23. Sun H, Feng J, Tang L. Function of TREM1 and TREM2 in liver-related diseases. *Cells* 2020;9(12).
 24. Tornai D, Furi I, Shen ZT, Sigalov AB, Coban S, Szabo G. Inhibition of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 ameliorates inflammation and macrophage and neutrophil activation in alcoholic liver disease in mice. *Hepatol Commun* 2019;3:99–115.
 25. Nguyen-Lefebvre AT, Ajith A, Portik-Dobos V, Horuzsko DD, Arbab AS, Dzutsev A, Sadek R, Trinchieri G, Horuzsko A. The innate immune receptor TREM-1 promotes liver injury and fibrosis. *J Clin Invest* 2018;128:4870–4883.
 26. Wang L, Aschenbrenner D, Zeng Z, Cao X, Mayr D, Mehta M, Capitani M, Warner N, Pan J, Wang L, Li Q, Zuo T, Cohen-Kedar S, Lu J, Ardy RC, Mulder DJ, Dissanayake D, Peng K, Huang Z, Li X, Wang Y, Wang X, Li S, Bullers S, Gammage AN, Warnatz K, Schiefer AI, Krivan G, Goda V, Kahr WHA, Lemaire M, Genomics England Research C, Lu CY, Siddiqui I, Surette MG, Kotlarz D, Engelhardt KR, Griffin HR, Rottapel R, Decaluwe H, Laxer RM, Proietti M, Hambleton S, Elcombe S, Guo CH, Grimbacher B, Dotan I, Ng SC, Freeman SA, Snapper SB, Klein C, Boztug K, Huang Y, Li D, Uhlig HH, Muise AM. Gain-of-function variants in SYK cause immune dysregulation and systemic inflammation in humans and mice. *Nat Genet* 2021;53:500–510.
 27. Deckert M, Tartare-Deckert S, Hernandez J, Rottapel R, Altman A. Adaptor function for the Syk kinases-interacting protein 3BP2 in IL-2 gene activation. *Immunity* 1998;9:595–605.
 28. Deckert M. [The adaptor protein 3BP2 in leukocyte signaling]. *Med Sci (Paris)* 2006;22:1081–1086.
 29. Foucault I, Le Bras S, Charvet C, Moon C, Altman A, Deckert M. The adaptor protein 3BP2 associates with VAV guanine nucleotide exchange factors to regulate NFAT activation by the B-cell antigen receptor. *Blood* 2005;105:1106–1113.
 30. GuezGuez A, Prod'homme V, Mouska X, Baudot A, Blin-Wakkach C, Rottapel R, Deckert M. 3BP2 adapter protein is required for receptor activator of NFkappaB ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. *J Biol Chem* 2010;285:20952–20963.
 31. Prod'Homme V, Boyer L, Dubois N, Mallavialle A, Munro P, Mouska X, Coste I, Rottapel R, Tartare-Deckert S, Deckert M. Cherubism allele heterozygosity amplifies microbe-induced inflammatory responses in murine macrophages. *J Clin Invest* 2015;125:1396–1400.
 32. Ueki Y, Tiziani V, Santanna C, Fukai N, Maulik C, Garfinkle J, Ninomiya C, doAmaral C, Peters H, Habal M, Rhee-Morris L, Doss JB, Kreiborg S, Olsen BR, Reichenberger E. Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nat Genet* 2001;28:125–126.
 33. Ueki Y, Lin CY, Senoo M, Ebihara T, Agata N, Onji M, Saheki Y, Kawai T, Mukherjee PM, Reichenberger E, Olsen BR. Increased myeloid cell responses to M-CSF

- and RANKL cause bone loss and inflammation in SH3BP2 "cherubism" mice. *Cell* 2007;128:71–83.
34. Deckert M, Prod'Homme V. [SH3BP2 heterozygous mutation amplifies macrophage inflammatory responses to infection in a mouse model of cherubism]. *Med Sci (Paris)* 2015;31:589–591.
 35. Reichenberger EJ, Levine MA, Olsen BR, Papadaki ME, Lietman SA. The role of SH3BP2 in the pathophysiology of cherubism. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7(Suppl 1):S5.
 36. Yoshitaka T, Mukai T, Kittaka M, Alford LM, Masrani S, Ishida S, Yamaguchi K, Yamada M, Mizuno N, Olsen BR, Reichenberger EJ, Ueki Y. Enhanced TLR-MYD88 signaling stimulates autoinflammation in SH3BP2 cherubism mice and defines the etiology of cherubism. *Cell Rep* 2014;8:1752–1766.
 37. Yoshimoto T, Hayashi T, Kondo T, Kittaka M, Reichenberger EJ, Ueki Y. Second-generation SYK inhibitor entospletinib ameliorates fully established inflammation and bone destruction in the cherubism mouse model. *J Bone Miner Res* 2018;33:1513–1519.
 38. Bertola A, Park O, Gao B. Chronic plus binge ethanol feeding synergistically induces neutrophil infiltration and liver injury in mice: a critical role for E-selectin. *Hepatology* 2013;58:1814–1823.
 39. Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL, Tybulewicz VL. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 1995;378:298–302.
 40. Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 1995;378:303–306.
 41. Kurniawan DW, Jajoriya AK, Dhawan G, Mishra D, Argemi J, Bataller R, Storm G, Mishra DP, Prakash J, Bansal R. Therapeutic inhibition of spleen tyrosine kinase in inflammatory macrophages using PLGA nanoparticles for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *J Control Release* 2018;288:227–238.
 42. Levaot N, Voytyuk O, Dimitriou I, Sircoulomb F, Chandrakumar A, Deckert M, Krzyzanowski PM, Scotter A, Gu S, Janmohamed S, Cong F, Simoncic PD, Ueki Y, La Rose J, Rottapel R. Loss of Tankyrase-mediated destruction of 3BP2 is the underlying pathogenic mechanism of cherubism. *Cell* 2011;147:1324–1339.
 43. de Jesus AA, Canna SW, Liu Y, Goldbach-Mansky R. Molecular mechanisms in genetically defined auto-inflammatory diseases: disorders of amplified danger signaling. *Annu Rev Immunol* 2015;33:823–874.
 44. Levaot N, Simoncic PD, Dimitriou ID, Scotter A, La Rose J, Ng AH, Willett TL, Wang CJ, Janmohamed S, Grynopas M, Reichenberger E, Rottapel R. 3BP2-deficient mice are osteoporotic with impaired osteoblast and osteoclast functions. *J Clin Invest* 2011;121:3244–3257.
 45. Zhao GN, Zhang P, Gong J, Zhang XJ, Wang PX, Yin M, Jiang Z, Shen LJ, Ji YX, Tong J, Wang Y, Wei QF, Wang Y, Zhu XY, Zhang X, Fang J, Xie Q, She ZG, Wang Z, Huang Z, Li H. Tmbim1 is a multivesicular body regulator that protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice and monkeys by targeting the lysosomal degradation of Tlr4. *Nat Med* 2017;23:742–752.
 46. Li L, Chen L, Hu L, Liu Y, Sun HY, Tang J, Hou YJ, Chang YX, Tu QQ, Feng GS, Shen F, Wu MC, Wang HY. Nuclear factor high-mobility group box1 mediating the activation of Toll-like receptor 4 signaling in hepatocytes in the early stage of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology* 2011;54:1620–1630.
 47. Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C, Merad M, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* 2009;50:261–274.
 48. Seki E, de Minicis S, Inokuchi S, Taura K, Miyai K, van Rooijen N, Schwabe RF, Brenner DA. CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 2009;50:185–197.
 49. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, Huss S, Klussmann S, Eulberg D, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 2012;61:416–426.
 50. Parker R, Weston CJ, Miao Z, Corbett C, Armstrong MJ, Ertl L, Ebsworth K, Walters MJ, Baumart T, Newland D, McMahon J, Zhang P, Singh R, Campbell J, Newsome PN, Charo I, Schall TJ, Adams DH. CC chemokine receptor 2 promotes recruitment of myeloid cells associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2018;314:G483–G493.
 51. Bertola A, Bonnafous S, Anty R, Patouraux S, Saint-Paul MC, Iannelli A, Gugenheim J, Barr J, Mato JM, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Gual P. Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One* 2010;5:e13577.
 52. Krenkel O, Puengel T, Govaere O, Abdallah AT, Mossanen JC, Kohlhepp M, Liepelt A, Lefebvre E, Luedde T, Hellerbrand C, Weiskirchen R, Longrich T, Costa IG, Anstee QM, Trautwein C, Tacke F. Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis. *Hepatology* 2018;67:1270–1283.
 53. Patouraux S, Rousseau D, Bonnafous S, Lebeaupin C, Luci C, Canivet CM, Schneck AS, Bertola A, Saint-Paul MC, Iannelli A, Gugenheim J, Anty R, Tran A, Bailly-Maitre B, Gual P. CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2017;67:328–338.
 54. Ibrahim SH, Hirsova P, Gores GJ. Non-alcoholic steatohepatitis pathogenesis: sublethal hepatocyte injury as a driver of liver inflammation. *Gut* 2018;67:963–972.
 55. Gautheron J, Gores GJ, Rodrigues CMP. Lytic cell death in metabolic liver disease. *J Hepatol* 2020;73:394–408.
 56. Liss KH, Finck BN. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimie* 2017;136:65–74.
 57. Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPARalpha-dependent hepatic

- lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2003;38:123–132.
58. Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I. Administration of the potent PPAR α agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004;39:1286–1296.
 59. Bukong TN, Iracheta-Vellve A, Gyongyosi B, Ambade A, Catalano D, Kodys K, Szabo G. Therapeutic benefits of spleen tyrosine kinase inhibitor administration on binge drinking-induced alcoholic liver injury, steatosis, and inflammation in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2016;40:1524–1530.
 60. Chen G, Dimitriou ID, La Rose J, Ilangumaran S, Yeh WC, Doody G, Turner M, Gommerman J, Rottapel R. The 3BP2 adapter protein is required for optimal B-cell activation and thymus-independent type 2 humoral response. *Mol Cell Biol* 2007;27:3109–3122.
 61. Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, Iannelli A, Staccini-Myx A, Casanova D, Ben Amor I, Saint-Paul MC, Huet PM, Sadoul JL, Gugenheim J, Srai SK, Tran A, Le Marchand-Brustel Y. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 2006;131:788–796.
 62. Anty R, Bekri S, Luciani N, Saint-Paul MC, Dahman M, Iannelli A, Ben Amor I, Staccini-Myx A, Huet PM, Gugenheim J, Sadoul JL, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Gual P. The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, type 2 diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1824–1833.
 63. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004;27:1487–1495.
 64. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313–1321.
 65. Sans A, Bonnafous S, Rousseau D, Patouraux S, Canivet CM, Leclere PS, Tran-Van-Nhieu J, Luci C, Bailly-Maitre B, Xu X, Lee AH, Minehira K, Anty R, Tran A, Iannelli A, Gual P. The differential expression of cide family members is associated with nafld progression from steatosis to steatohepatitis. *Sci Rep* 2019;9:7501.
 66. Canivet CM, Bonnafous S, Rousseau D, Leclere PS, Lacas-Gervais S, Patouraux S, Sans A, Luci C, Bailly-Maitre B, Iannelli A, Tran A, Anty R, Gual P. Hepatic FNDC5 is a potential local protective factor against non-alcoholic fatty liver. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020;1866:165705.

Received March 6, 2021. Accepted August 10, 2021.

Correspondence

Address correspondence to: Philippe Gual, PhD, Inserm UMR1065/C3M, Bâtiment Universitaire ARCHIMED, Team "Chronic liver diseases associated with obesity and alcohol", 151 route Saint Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice, France. e-mail: philippe.gual@inserm.fr; fax: +33 4 89 06 42 60. Marcel Deckert, PhD, Inserm UMR1065/C3M, Bâtiment Universitaire ARCHIMED, Team "Microenvironment, signaling and cancer", 151 route Saint Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice, France. e-mail: marcel.deckert@inserm.fr.

Acknowledgments

The authors thank the INSERM U1065 animal facility staff and Dr V. Corcelle, the INSERM U1065 flow cytometry platform, Dr Jeanne Tran-Van-Nhieu (HU Henri Mondor, Department of Pathology, AP-HP - Université Paris Est Créteil, Créteil, France) for providing the liver tissues from lean subjects, and Professor Robert Rottapel (Princess Margaret Cancer Center, University of Toronto, Toronto, Canada) for providing the Sh3bp2 KO mice.

CRedit Authorship Contributions

Carmelo Luci, PhD (Formal analysis: Equal; Investigation: Equal; Methodology: Equal; Project administration: Equal; Writing – review & editing: Equal)

Elodie Vieira, PhD (Formal analysis: Equal; Investigation: Equal; Methodology: Equal; Writing – review & editing: Supporting)

Manon Bourinet (Formal analysis: Supporting; Investigation: Supporting; Methodology: Supporting; Writing – review & editing: Supporting)

Déborah Rousseau, PhD (Formal analysis: Supporting; Investigation: Supporting; Methodology: Supporting; Writing – review & editing: Supporting)

Stéphanie Bonnafous (Formal analysis: Supporting; Investigation: Supporting; Methodology: Supporting; Writing – review & editing: Supporting)

Stéphanie Patouraux, PhD, MD (Formal analysis: Supporting; Investigation: Supporting; Writing – review & editing: Supporting)

Lauren Lefevre (Formal analysis: Supporting; Investigation: Supporting; Writing – review & editing: Supporting)

Frederic Larbret, PhD (Formal analysis: Supporting; Investigation: Supporting; Writing – review & editing: Supporting)

Virginie Prod'homme, PhD (Formal analysis: Supporting; Investigation: Supporting; Writing – review & editing: Supporting)

Antonio Iannelli, PhD, MD (Writing – review & editing: Supporting; Human liver biopsies: Lead)

Albert Tran, PhD, MD (Writing – review & editing: Supporting; Human liver biopsies: Lead)

Rodolphe Anty, PhD, MD (Writing – review & editing: Supporting; Human liver biopsies: Lead)

Béatrice Bailly-Maitre, PhD (Funding acquisition: Supporting; Writing – review & editing: Supporting)

Marcel Deckert, PhD (Conceptualization: Lead; Formal analysis: Lead; Funding acquisition: Lead; Supervision: Equal; Validation: Equal; Writing – review & editing: Lead)

Philippe Gual, PhD (Conceptualization: Lead; Formal analysis: Lead; Funding acquisition: Lead; Investigation: Lead; Project administration: Lead; Supervision: Lead; Writing – original draft: Lead; Writing – review & editing: Lead)

Conflicts of interest

The authors disclose no conflicts.

Funding

Supported by grants from INSERM (France), charities (Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF) to PG, Société Francophone du Diabète (SFD) to PG, SFD/Roche Pharma to PG, and SFD and LifeScan to BBM. This work was also funded by the French Government (National Research Agency, ANR): #ANR-18-CE14-0019-01, #ANR-18-CE14-0019-02, #ANR-18-CE14-0022-01, #ANR-19-CE14-0044-01, and through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE (#ANR-11-LABX-0028-01) and the UCA^{JEDI} Investments in the Future project (#ANR-15-IDEX-01). EV was supported by a PhD grant from the Fondation pour la Recherche Médicale and LL and MB by the ANR (#ANR-18-CE14-0019-01 and #ANR-18-CE14-0019-02, respectively). MB is currently supported by a doctoral fellowship from French Ministry of Research.

ORIGINAL ARTICLE

Obesity Biology and Integrated Physiology

Osteopontin-driven T-cell accumulation and function in adipose tissue and liver promoted insulin resistance and MAFLD

Frédéric Soysouvanh¹ | Déborah Rousseau¹ | Stéphanie Bonnafous² |
 Manon Bourinet¹ | Axelle Strazzulla¹ | Stéphanie Patouraux² |
 Jean Machowiak¹ | Marwin A. Farrugia² | Antonio Iannelli² | Albert Tran² |
 Rodolphe Anty² | Carmelo Luci¹ | Philippe Gual¹ 

¹Université Côte d'Azur, INSERM, U1065, C3M, Nice, France

²Université Côte d'Azur, CHU, INSERM, U1065, C3M, Nice, France

Correspondence

Philippe Gual, Inserm UMR1065/C3M, Bâtiment Universitaire ARCHIMED, Team "Chronic Liver Diseases Associated with Obesity and Alcohol," 151 route Saint-Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice, Cedex 03, France.
 Email: philippe.gual@inserm.fr

Funding information

French Government, National Research Agency, Grant/Award Numbers: #ANR-18-CE14-0019-02, #ANR-19-CE14-0044-01, #ANR-21-CE14-0015-03, #ANR-22-CE14-0027-01; Association Française pour l'Etude du Foie; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); LabEx SIGNALIFE, Grant/Award Number: #ANR-11-LABX-0028-01; UCA JEDI, Grant/Award Number: #ANR-15-IDEX-01; La Société Nationale Française de Gastro-Entérologie (SNFGE)-FARE

Abstract

Objective: This study investigated the contribution of osteopontin/secreted phosphoprotein 1 (SPP1) to T-cell regulation in initiation of obesity-driven adipose tissue (AT) inflammation and macrophage infiltration and the subsequent impact on insulin resistance (IR) and metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) development.

Methods: SPP1 and T-cell marker expression was evaluated in AT and liver according to type 2 diabetes and MAFLD in human individuals with obesity. The role of SPP1 on T cells was evaluated in *Spp1*-knockout mice challenged with a high-fat diet.

Results: In humans with obesity, elevated SPP1 expression in AT was parallel to T-cell marker expression (CD4, CD8A) and IR. Weight loss reversed AT inflammation with decreased SPP1 and CD8A expression. In liver, elevated SPP1 expression correlated with MAFLD severity and hepatic T-cell markers. In mice, although *Spp1* deficiency did not impact obesity, it did improve AT IR associated with prevention of proinflammatory T-cell accumulation at the expense of regulatory T cells. *Spp1* deficiency also decreased *ex vivo* helper T cell, subtype 1 (Th1) polarization of AT CD4⁺ and CD8⁺ T cells. In addition, *Spp1* deficiency significantly reduced obesity-associated liver steatosis and inflammation.

Conclusions: Current findings highlight a critical role of SPP1 in the initiation of obesity-driven chronic inflammation by regulating accumulation and/or polarization of T cells. Early targeting of SPP1 could be beneficial for IR and MAFLD treatment.

INTRODUCTION

Adipose tissue (AT) inflammation and insulin resistance (IR) play a central role in the development of type 2 diabetes (T2D) and liver

complications such as metabolic-associated fatty liver diseases (MAFLD) [1], which are the most common chronic liver diseases with a worldwide prevalence of 32% [2]. The overall prevalence of MAFLD is growing in parallel with the global epidemic of obesity [3]. The term "MAFLD" covers the full spectrum of fatty liver disease, from fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), fibrosis/cirrhosis, and

Frédéric Soysouvanh and Déborah Rousseau contributed equally to this work.

hepatocellular carcinoma [4]. In humans with obesity, macrophage accumulation in visceral AT (VAT) is associated with inflammation and liver fibrosis [5]. Many recent studies have demonstrated the complexity and diversity of AT macrophages and their location according to obesity and IR [6]. For example, CD11C⁺CD9⁺TREM2⁺ (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) macrophage accumulation in crown-like structures around damaged or dying adipocytes are lipid-laden and have an inflammatory signature including elevated expression of secreted phosphoprotein 1 (SPP1) [6]. Inhibition of macrophage accumulation in AT of mice with obesity leads to decreased inflammation, IR, and liver steatosis [7–11].

However, development of AT chronic inflammation is much more complex. T cells are significantly involved in the initiation of obesity-driven AT inflammation and macrophage infiltration [12–15]. Obesity alters the properties of T cells in AT, prior to macrophage infiltration [12, 13]. In epididymal white AT (eWAT) of lean mice, helper T cell, subtype 2 (Th2) cells (CD4⁺) and regulatory T cells (Tregs) (CD4⁺FOXP3⁺ [forkhead box protein P3]) are the most frequent. Such cells help to maintain low inflammatory activity. With obesity, Treg frequency decreases while the proportion of CD8⁺ effector T cells and CD4⁺ Th1 T cells increases in eWAT. This imbalance strongly contributes to the development of inflammation and IR in eWAT. Indeed, enrichment of interferon- γ (IFN γ), secreted by Th1 T cells, triggers macrophage polarization toward a proinflammatory phenotype, whereas decreased interleukin IL-4 and IL-13 cytokines secreted by Th2 contribute to the reduction of anti-inflammatory macrophages [16]. Depletion of CD8⁺ or CD3⁺ cells decreases AT macrophage numbers and IR [13, 14, 17]. Conversely, increased Treg frequency partially corrects IR [16]. Regulation of T-cell frequency and polarization may directly contribute to macrophage polarization and the development of AT inflammation and IR. We also reported the accumulation of dendritic cells (DCs), as a key regulator of T cells, in AT in mouse and human obesity. These DCs were functional and they could be important regulators of AT T-dependent inflammation [18]. The identification of a specific T-cell receptor signature of T cells in AT also indicates a specific antigenic profile in this tissue [12, 13].

Among the potential factors highly involved in the initiation of AT and liver inflammation in the context of obesity, we here focused on SPP1, also called osteopontin. SPP1 is a matrix protein that acts as a chemoattractant for many cell types, including DCs, T cells, and macrophages. AT levels of SPP1 are dramatically elevated and they lead to the recruitment of AT macrophages in diet-induced obesity models [11, 17, 19, 20]. We also reported that SPP1 expression was directly related to macrophage accumulation in human subcutaneous AT (SCAT) [21]. In contrast, it was reported that SPP1 neutralization with antibodies attenuated liver and AT macrophage infiltration and inflammatory gene expression [17]. However, SPP1 is also key regulator of T cells and it regulates the Th1 response [22, 23]. Since only a correlation between SPP1 gene expression and T-cell markers in AT has been reported [24], we here investigated its potential role in these processes, focusing on T-cell recruitment and polarization in AT and liver in a mouse model of obesity and in *Spp1*-knockout (KO) mice. Its human relevance was also investigated in the context of obesity, T2D, and MAFLD, as well as after weight loss.

Study Importance

What is already known?

- Osteopontin, also known as secreted phosphoprotein 1 (SPP1), is upregulated in human and mouse adipose tissue (AT) in obesity.
- SPP1 contributes to AT inflammation by regulating macrophage accumulation and activity.
- T-cell dysregulation in AT precedes macrophage accumulation during the development of insulin resistance.

What does this study add?

- SPP1 contributes to T-cell infiltration and helper T cell, subtype 1 (Th1) polarization in initiation of obesity-driven AT inflammation in mice and humans. Weight loss reverses SPP1 and T-cell marker expression in AT as well as inflammation in humans.
- Targeting SPP1 prevents AT inflammation and liver steatosis, injury, and inflammation in a preclinical study.
- Liver SPP1 expression increases with metabolic-associated fatty liver disease severity and correlates with T-cell marker expression in humans.

How might these results change the direction of research or the focus of clinical practice?

- This finding suggests that refocusing therapeutic approaches to target SPP1-dependent pathways regulating both T cells and macrophages may contribute to more effective treatments.

METHODS

Human studies

Human individuals with severe obesity ($n = 55$) were recruited through the Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation (L'Archet Nice University Hospital) where they underwent bariatric surgery. Bariatric surgery was indicated for these patients in accordance with French guidelines. Exclusion criteria were hepatitis B or C infection, excessive alcohol consumption (>20 g/d), or another cause of chronic liver disease as previously described [25–27]. The characteristics of the study groups are described in Table 1; 20 and 35 patients were included in the AT (“SCAT group”) and liver (“liver group”) studies, respectively. Before surgery, fasting blood samples were obtained and used to measure liver enzymes (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase), glucose, insulin, and hemoglobin A_{1c}. IR was calculated using the homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index [28]. Surgical liver and SCAT biopsies were obtained during surgery, and no ischemic

TABLE 1 Characteristics of study participants with obesity included in two independent studies (SCAT group or liver group)

	SCAT group		Liver group		
	With obesity	With T2D	Without MAFLD	With steatosis	With NASH
<i>n</i>	10	10	8	15	12
Age (y)	34.6 ± 2.8	47.4 ± 2.0 ^a	37.7 ± 4.4	34.0 ± 4.3	41.3 ± 3.0
BMI (kg/m ²)	42.8 ± 2.0	46.9 ± 1.9	43.4 ± 0.5	44.2 ± 1.2	44.2 ± 1.7
ALT (IU/L)	20.2 ± 2.9	29.7 ± 4.3 ^a	17.3 ± 2.9	31.2 ± 2.8 ^b	91.7 ± 21.8 ^{b,c}
AST (IU/L)	19.2 ± 1.5	31.2 ± 7.8 ^a	20.7 ± 2.9	23.2 ± 1.4	57.9 ± 11.9 ^{b,c}
Fasting insulin (mIU/L)	9.6 ± 1.1	23.3 ± 4.6 ^a	9.7 ± 2.4	15.4 ± 3.3	38.3 ± 7.9 ^{b,c}
Fasting glucose (mmol/L)	5.0 ± 0.1	9.3 ± 1.2 ^a	4.8 ± 0.1	5.3 ± 0.1 ^b	7.6 ± 1.2 ^b
HOMA-IR	2.1 ± 0.2	9.8 ± 2.5 ^a	2.0 ± 0.4	3.7 ± 0.8	12.7 ± 3.0 ^{b,c}
HbA _{1c} (%)	5.4 ± 0.1	7.8 ± 0.6 ^a	5.3 ± 0.1	5.6 ± 0.1	6.7 ± 0.4 ^{b,c}
NAFLD activity score (<i>n</i>)	0 (1) 1 (7) 3 (2)	2 (5) 2 (5)	0 (8)	2 (6) 3 (9)	5 (12)
Grade of steatosis (<i>n</i>)	0 (1) 1 (7) 3 (2)	2 (5) 2 (5)	0 (8)	2 (6) 3 (9)	3 (12)
Lobular inflammation (<i>n</i>)	0 (10)	0 (10)	0 (8)	0 (15)	1 (12)
Hepatocellular ballooning (<i>n</i>)	0 (10)	0 (10)	0 (8)	0 (15)	1 (12)

Note: SCAT group: “With obesity” subgroup: participants with obesity; “With T2D” subgroup: participants with obesity and type 2 diabetes. Data are expressed as mean ± SEM and compared using the nonparametric Mann–Whitney test: ^a*p* < 0.05, compared with “With obesity” subgroup. Liver group: “Without MAFLD” subgroup: participants with normal liver histology; “With steatosis” subgroup: participants with steatosis; “With NASH” subgroup: participants with severe steatosis and NASH. Data are expressed as mean ± SEM and compared using the nonparametric Mann–Whitney test: ^b*p* < 0.05, compared with “Without MAFLD” subgroup and ^c*p* < 0.05, compared with “With steatosis” subgroup.

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; HbA_{1c}, hemoglobin A1c; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; MAFLD, metabolic-associated fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; SCAT, subcutaneous adipose tissue; T2D, type 2 diabetes.

preconditioning was performed. Hepatic histopathological analysis was performed according to the scoring system of Kleiner et al. [29]. Four histopathological features were semiquantitatively evaluated: grade of steatosis (0: <5% fatty hepatocytes; 1: 5%–30% fatty hepatocytes; 2: >30%–60% fatty hepatocytes; 3: >60% fatty hepatocytes), lobular inflammation (0: no inflammatory foci; 1: <2 inflammatory foci per 200x field; 2: 2–4 inflammatory foci per 200x field; 3: >4 inflammatory foci per 200x field), hepatocellular ballooning (0: none; 1: few balloon cells; 2: many cells/prominent ballooning), and stage of fibrosis (from 0 [none] to 4 [cirrhosis]). In addition, abdominal SCAT was obtained from six women before (40.7 ± 3.1 years old; BMI, 43.1 ± 2.0 kg/m²) and 2 years after (BMI, 26.0 ± 3.8 kg/m²) weight loss following bariatric surgery (mean weight loss: 44.3 ± 11.4 kg). The second surgery (abdominoplasty) was performed for cosmetic purposes. In a control group, liver tissue was obtained from five lean participants (five women; 44 ± 9 years old; BMI, 21 ± 1.9 kg/m²) undergoing partial hepatectomy for benign tumors (neighbor tissues from four adenoma and one focal nodular hyperplasia). Three participants were undergoing a left lobectomy or a bisegmentectomy without ischemic preconditioning, and two participants were undergoing a right hepatectomy with a potential ischemic preconditioning (missing data). Liver samples did not display hepatic steatosis, inflammation, or fibrosis. Control SCAT was obtained from seven lean participants (three females and four males; 35.5 ± 10.8 years old; BMI, 22.9 ± 2.4 kg/m²) undergoing lipectomy for cosmetic purposes. All participants gave their informed written consent to participate in this study in accordance with French legislation regarding Ethics and Human Research. The “Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Nice” approved the study (07/04:2003, No. 03.017).

Animals and study design

Eight-week-old male wild-type (Wt) and SPP1-deficient (*Spp1*-KO) (B6.129S6[*cg*]-*spp1* tm1Blh/J from Jackson Laboratory) mice were used. Male C57BL/6J mice were acclimated to our animal facility under a 12/12-hour light/dark cycle at a temperature of 21 ± 2 °C and were fed ad libitum either a high-fat diet (HFD; 45% of kilocalories from fat, 72.4% of kilocalories from carbohydrate, 20% of kilocalories from protein) (D12451; Research Diets) or a normal diet (ND; 8.4% of kilocalories from fat, 72.4% of kilocalories from carbohydrate [nitrogen-free extract], 19.3% of kilocalories from protein) (A04; Safe) for 33 weeks. One part of the biopsies was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C for gene expression analysis. The second part was fixed in buffered formalin, paraffin-embedded, sectioned, and stained with hematoxylin–eosin–safran and picro-sirius red, and the last part was used for flow cytometric analysis. The guidelines of laboratory animal care were followed, and the local ethical committee approved the animal experiments (Comité Institutionnel d’Ethique Pour l’Animal de Laboratoire [CIEPAL] agreement no. 28) (NCE/2013–108) (APAFIS #3223-2,015,121,110,477,413-v2) (C3M animal facility: B06-088-20).

For further details, please refer to the online Supporting Information.

RESULTS

SCAT expression of SPP1 correlated with local T-cell accumulation and inflammation in humans

We previously reported that elevated expression of SPP1 was related to AT macrophage accumulation in human obesity [21]. Since T cells are

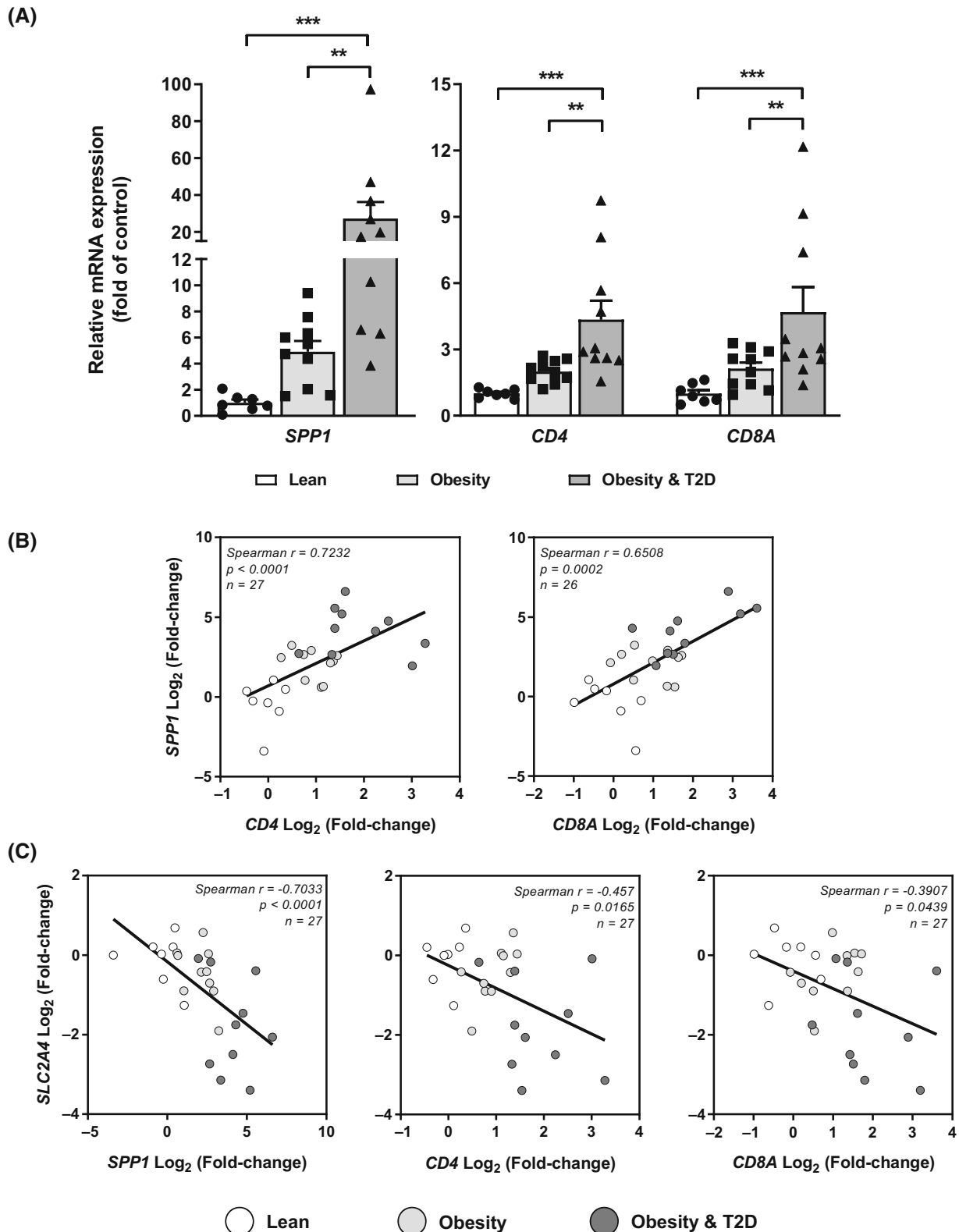


FIGURE 1 Subcutaneous adipose tissue (SCAT) expression of *SPP1* correlates with T-cell and insulin resistance markers in human individuals with obesity. SCAT *SPP1*, *CD4*, *CD8A*, and *SLC2A4* mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction in lean participants ($n = 7$) and in participants with severe obesity without ($n = 10$) and with type 2 diabetes (T2D) ($n = 10$). Gene expression was normalized to the mRNA levels of *RPLP0*. (A) Relative expression levels of *SPP1*, *CD4*, *CD8A* compared with lean participants (mean \pm SEM). Statistical differences between groups were analyzed by one-way ANOVA. Post hoc comparisons were performed using Benjamini, Krieger, and Yekutieli correction. ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$. (B) Correlations between SCAT *SPP1* expression (fold change) and SCAT expression of *CD4* and *CD8A* were analyzed using Spearman correlation test. (C) Correlations between SCAT *SLC2A4* expression and SCAT expression of *SPP1*, *CD4*, and *CD8A* were analyzed using Spearman correlation test.

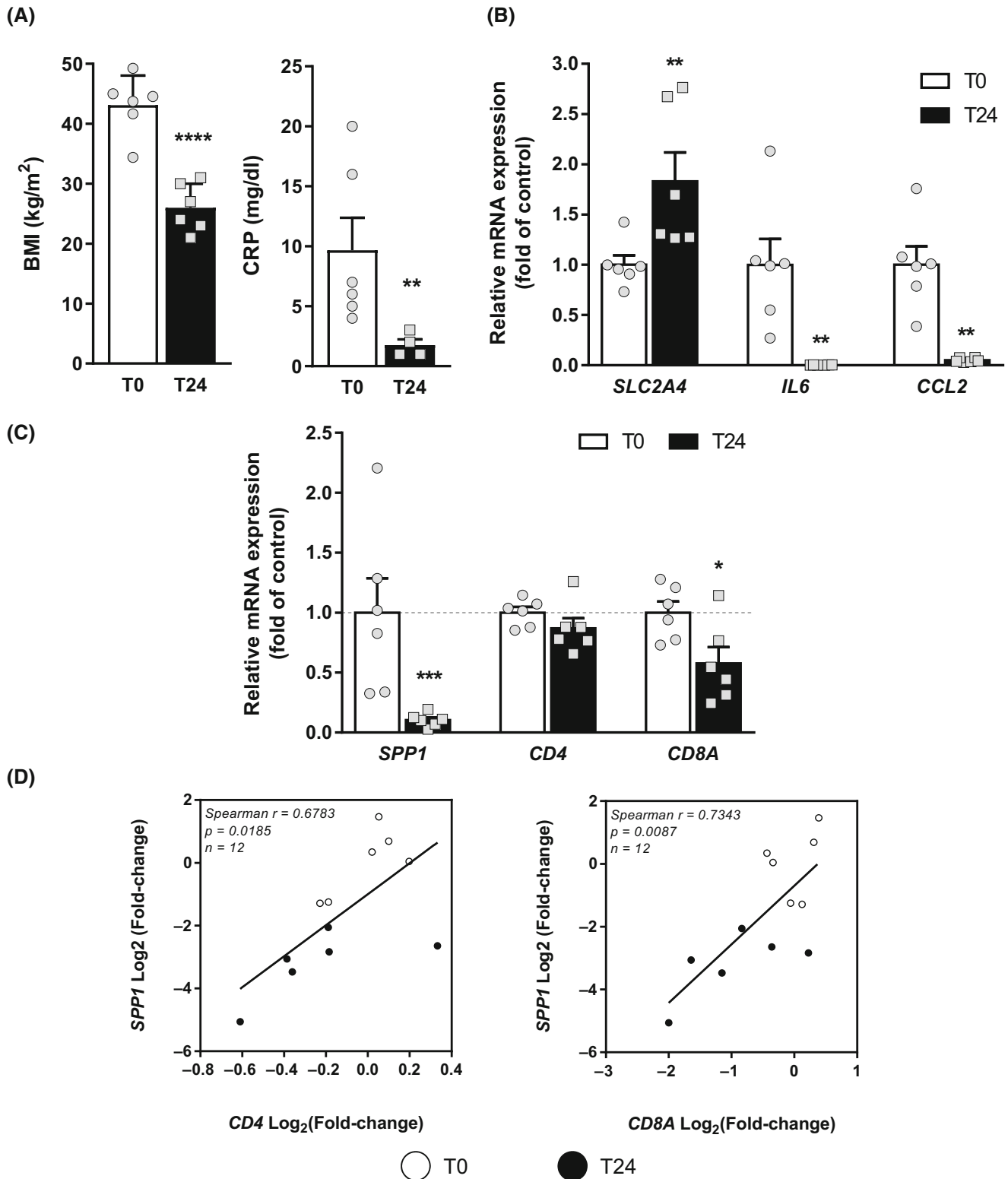


FIGURE 2 Weight loss in human individuals with obesity is associated with a robust decrease in the gene expression of *SPP1*, T-cell marker *CD8A*, and inflammatory markers in the subcutaneous adipose tissue (SCAT) group. (A) Six patients were studied before and 24 months after bariatric surgery for BMI and systemic inflammation (as evaluated by the circulating levels of C-reactive protein [CRP]). Mann-Whitney test, $**p \leq 0.01$ and $****p < 0.0001$. (B, C) *SPP1* and markers of insulin sensitivity (*SLC2A4*), inflammation (*IL6*, *CCL2*), and T cell (*CD4* and *CD8A*) mRNA expression were analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction in SCAT obtained from these participants before and after weight loss. Gene expression levels were normalized to *RPLP0* mRNA levels. Relative expression data compared with mRNA levels before surgery are shown (mean \pm SEM). Statistical differences were analyzed by one-way ANOVA. $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, and $****p < 0.0001$. (D) Spearman correlation between SCAT expression of *SPP1* and *CD4* and *CD8A*

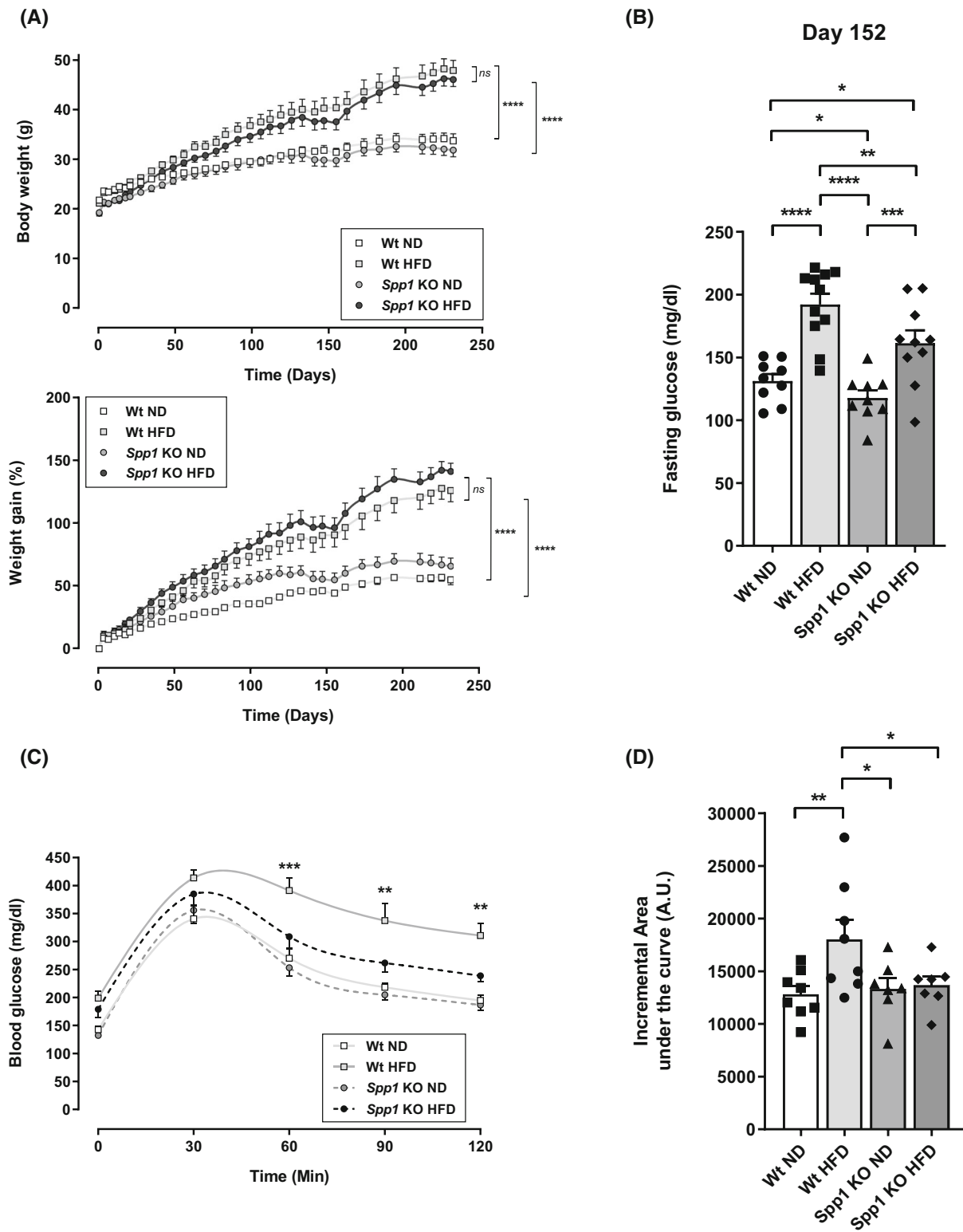


FIGURE 3 SPP1 deficiency prevents high-fat diet (HFD)-induced hyperglycemia and glucose intolerance without any change in body weight. Wild-type (Wt; square, $n = 20$) and *Spp1*^{-/-} (circle, $n = 19$) mice fed with normal diet (ND) or HFD. (A) Body weight and body weight gain were monitored for 33 weeks. (B) Fasting blood levels were evaluated 21 weeks after the beginning of the experiment. (C, D) Glucose tolerance tests after 21 weeks of diet challenge (seven to nine mice per group). Mice were first fasted for 8 hours with free access to water and then received an intraperitoneal injection of glucose solution (1 g/kg body weight; 250 mg/mL). (C) Blood glucose levels were measured before (baseline) and every 30 minutes over 120 minutes. (D) The incremental area under the curve was calculated. Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical differences between groups were analyzed by two-way ANOVA. Post hoc comparisons were performed using Benjamini, Krieger, and Yekutieli correction. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$. KO, knockout

key actors in the onset of chronic AT inflammation and obesity complications [4, 30, 31], we here examined the relationship between *SPP1* and T-cell marker expression and chronic inflammation associated with obesity and T2D in SCAT from patients with obesity after bariatric surgery. We first evaluated expression levels of *SPP1* and T-cell markers *CD4* and *CD8A* in SCAT of lean participants ($n = 7$) and participants with obesity without ($n = 10$) or with T2D. As shown in Table 1 (SCAT group), participants with T2D displayed more IR as evaluated by HOMA-IR and hemoglobin A_{1c} compared with participants with obesity. SCAT mRNA levels of *SPP1* progressively increased with obesity and then T2D (Figure 1A). In addition, SCAT mRNA levels of *CD4* and *CD8* were significantly upregulated with T2D (Figure 1A). These expressions strongly correlated with *SPP1* expression (Figure 1B). Among participants with T2D, 4 out of 10 participants with a very high SCAT level of *SPP1* (52.0 ± 15.6 vs. 10.7 ± 2.6 fold, $p = 0.0095$) also displayed the highest SCAT expression of *CD4* (6.6 ± 1.5 vs. 2.8 ± 0.4 fold, $p = 0.0019$) and *CD8A* (8.6 ± 2.1 vs. 3.0 ± 0.2 fold, $p = 0.0031$) and the highest blood fasting insulin levels (34.8 ± 8.4 vs. 15.7 ± 2.1 mIU/L, $p = 0.0095$) compared with participants with T2D with a mild elevation of *SPP1*. Since the inflammation contributes to impaired glucose transport in adipocytes, we then evaluated SCAT expression of solute carrier family 2 member 4 (*SLC2A4*, encoding GLUT4). *SLC2A4* mRNA expression was strongly decreased in SCAT of participants with T2D compared with participants with obesity or lean participants. This observation negatively correlated with HOMA-IR (Supporting Information Figure S1). Importantly, SCAT expression levels of *SPP1*, *CD4*, and *CD8A* negatively correlated with the expression of *SLC2A4* (Figure 1C). In addition, SCAT expression levels of *SPP1* and *CD4* positively correlated with HOMA-IR (Supporting Information Figure S1C). As expected, SCAT mRNA levels of macrophage marker *CD68* and DC marker *CD11c* were upregulated with T2D [18, 21], but they also correlated with *SPP1* expression (Supporting Information Figure S2A,B). Human AT inflammation is thus related to elevated expression of *SPP1* and T-cell markers.

Reduction of SCAT inflammation by weight loss concomitantly decreased local expression of *SPP1* and T-cell markers

We then determined whether weight loss could modify gene expression of *SPP1* and T-cell markers in abdominal SCAT. Six patients were reevaluated 2 years after bariatric surgery. As expected, these participants showed marked weight loss (-44.3 ± 11.4 kg) (BMI follow-up is shown in Figure 2A). This resulted in significant improvement in systemic inflammation (as assessed by circulating C-reactive protein levels) (Figure 2A), as well as SCAT inflammation and insulin sensitivity (as assessed by *IL6* and C-C motif chemokine ligand 2 [*CCL2*] levels and *SLC2A4* expression levels, respectively) (Figure 2B). Interestingly, SCAT *SPP1* and *CD8A* expression was significantly decreased and it correlated with each other (Figure 2C,D). Although the reduction of mRNA levels of *CD4* was not quite significant, its expression still correlated with *SPP1* (Figure 2C,D). The decreased *SPP1* expression also correlated with the expression of markers of myeloid cells (integrin subunit alpha M [*ITGAM*] encoding *CD11B*) and macrophages (*CD68*) (Supporting Information

Figure S3A,B). These findings indicate that *SPP1* expression is related to *CD4* and *CD8* T-cell accumulation and local inflammation in human AT.

SPP1 deficiency promoted the accumulation of anti-versus proinflammatory lymphocytes in AT, resulting in decreased local inflammatory activity in mice with obesity

To then determine whether *SPP1* contributes to T-cell accumulation in AT, we investigated the impact of its deficiency in mice with obesity. Wt littermate and *Spp1*-KO mice were fed with either control diet (ND) or HFD for 33 weeks (five to nine mice per group). No significant differences in body weight and body weight gain were found in basal and HFD-challenged conditions between Wt and *Spp1*-KO mice (Figure 3A). However, HFD-fed *Spp1*-KO mice exhibited lower fasting glycemia (Figure 3B) and better glucose tolerance (Figure 3C,D) compared with HFD-fed Wt mice. *Spp1*-KO mice also exhibited lower fed insulin levels compared with Wt mice after HFD challenge (assessed on four to six mice per group) (Supporting Information Figure S4A). These beneficial effects on IR were in line with previous reports [11, 17, 32]. Focusing on eWAT, we first found that *Spp1* expression was strongly increased in HFD-fed Wt mice compared with ND-fed Wt mice at the mRNA and protein levels (Figure 4A). In addition, eWAT of mice with obesity exhibited significant enrichment in *CD3*, *CD4*, and *CD8* T cells as assessed by flow cytometry analysis. In contrast, these recruitments were significantly reduced in *Spp1*-KO mice with obesity (Figure 4B). This *SPP1*-free environment was also associated with marked changes in T-cell polarization. In Wt mice with obesity versus lean Wt mice, the intracytoplasmic labeling of FOXP3 (Tregs) and IFN γ (Th1) on *CD45*⁺*CD4*⁺ cells revealed a twofold decrease in FOXP3⁺*CD4*⁺ cells (12.6% vs. 24.7%) (Figure 4B) and an approximately twofold increase in IFN γ ⁺*CD4*⁺ cells (24.1% vs. 15.6%) (Figure 4C). Interestingly, *Spp1*-KO mice with obesity exhibited more FOXP3-expressing *CD4* T cells (19.6% vs 12.6%) (Figure 4B) and a twofold decrease in IFN γ -expressing *CD4* T cells (12.1% vs. 24.1%) (Figure 4C) compared with Wt mice with obesity. The intracellular role of *SPP1* in T-cell polarization was then investigated in stromal vascular fractions of eWAT from lean Wt and *Spp1*-KO mice. The *ex vivo* activation of the stromal vascular fractions by anti-*CD3/CD28* antibodies was associated with a ~43% and ~27% reduction of IFN γ fold change in *CD8*⁺ and *CD4*⁺ cells in the absence of *SPP1*, respectively (mean of two independent experiments) (Figure 4D). These results highlight that local upregulation of *SPP1* plays an important role in the recruitment and most probably the T-cell polarization in eWAT.

SPP1 deficiency decreased AT inflammation and IR in mice with obesity

The local effect of *SPP1* deficiency on T cells in eWAT was also associated with a reduction of AT inflammation as assessed by the expression of macrophage marker adhesion G protein-coupled receptor E1 (*Emr1*) (cell surface glycoprotein F4/80) and DC marker integrin alpha

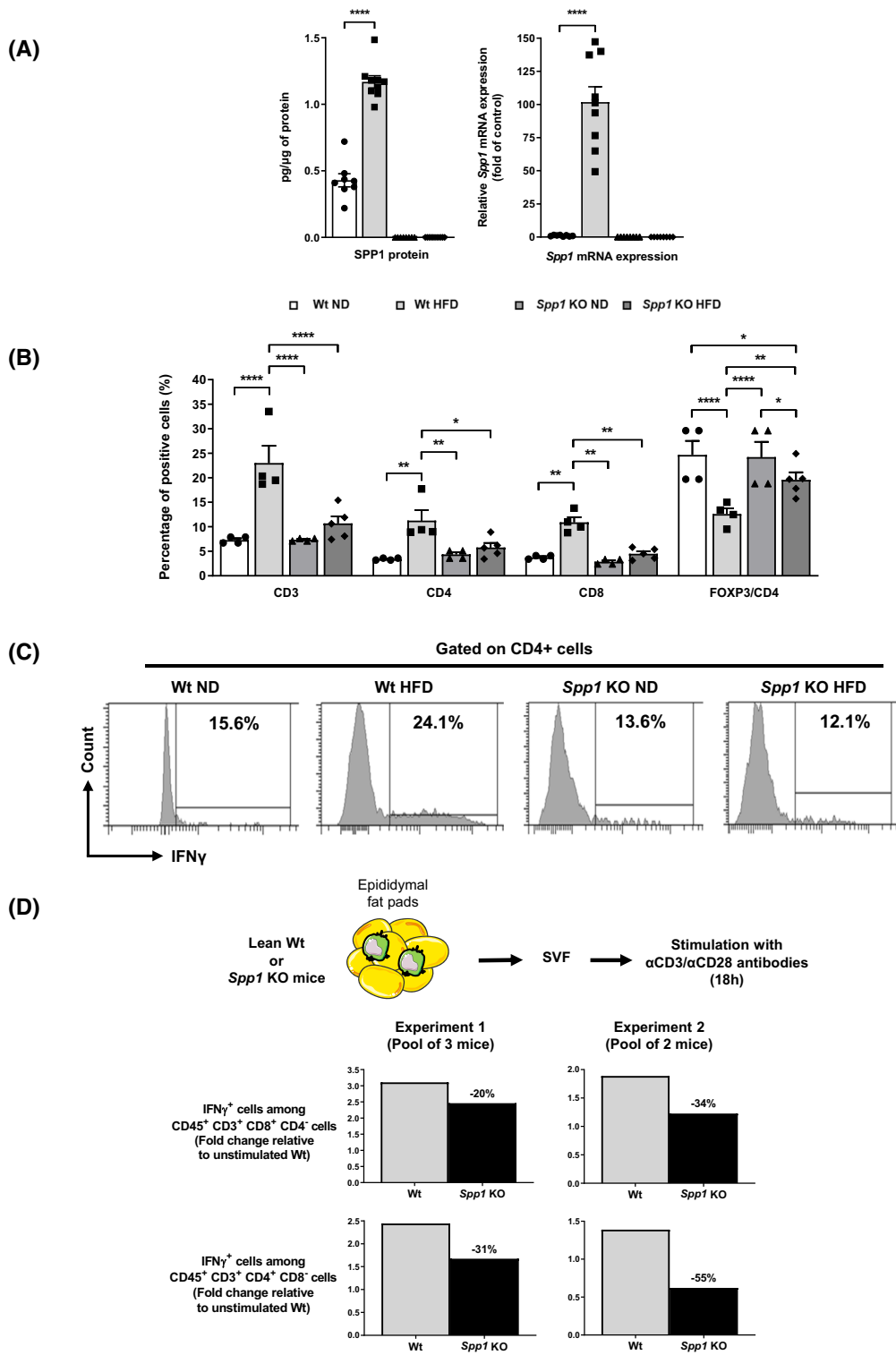


FIGURE 4 SPP1 deficiency decreases T-cell recruitment and Th1 polarization of CD4⁺ T cells while increasing accumulation of regulatory T cells in the epididymal white adipose tissue (eWAT) in response to high-fat diet (HFD). (A) eWAT *Spp1* mRNA and protein expression levels were analyzed in wild-type (Wt) mice fed with normal diet (ND; *n* = 8) or HFD (*n* = 9) and in *Spp1*-knockout (KO) mice fed with ND (*n* = 8) or HFD (*n* = 11). Data are expressed as mean \pm SEM and were statistically analyzed using the Mann-Whitney test. *****p* < 0.0001. (B, C) Epididymal fat pads were isolated from ND- and HFD-fed Wt and *Spp1*-KO mice (after 33 weeks of diet, four to five mice per group), and the stromal vascular fraction (SVF) was stained for CD45, CD3, CD4, CD8, and FOXP3. Data are expressed as mean \pm SEM. Data were statistically analyzed using two-way ANOVA. Post hoc comparisons were performed using Benjamini, Krieger, and Yekutieli correction. **p* \leq 0.05, ***p* \leq 0.01, and *****p* < 0.0001. (C) Analysis of intracytoplasmic levels of IFN γ in activated T cells. (D) SVF from six or four epididymal fat pads (as indicated) of lean Wt or *Spp1*-KO mice was stimulated or not with α CD3/ α CD28 antibodies. After 18 hours, SVF was stained for CD45, CD3, CD4, CD8, and IFN γ . Data are expressed as fold change relative to the unstimulated Wt condition, and reductions in percentage are indicated. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

X (*Itgax*) (CD11C) (Figure 5A). We then investigated the impact on impaired adipocyte functions. The latter could be related to decreased AKT activity (assessed by its phosphorylation level) and reduced expression of key players involved in lipid mobilization, such as the domain-2-containing patatin-like phospholipase (*Pnpla2*) and hormone-sensitive lipase (*Lipe*), as well as glucose transport (*Slc2a4*). Under fed conditions, the levels of AKT phosphorylation and PNPLA2 in eWAT decreased with obesity and SPP1 deficiency partially prevented these reductions (Figure 5B). At the mRNA level, eWAT expression levels of *Pnpla2*, *Lipe*, and *Slc2a4* were drastically decreased in Wt mice with obesity versus lean Wt mice (Figure 5C). Interestingly, these reductions were smaller in the *Spp1*-KO mice with obesity. In line with these results, Chapman et al. previously reported that HFD-fed *Spp1*-KO mice were protected against the severe AT IR (as assessed by hyperinsulinemic euglycemic clamp and acute insulin stimulation studies) that developed in Wt controls [32]. These results could demonstrate that SPP1 contributes to chronic low-grade inflammation and IR of AT associated with obesity by regulating the T-lymphocyte-dependent inflammation.

SPP1 deficiency decreased liver steatosis, liver injury, and Th1 marker expression in mice with obesity

Because fat tissue plays a key role in the genesis of IR and liver complications, we then evaluated the effect of SPP1 deficiency on liver complications. The transaminase levels were first evaluated, as an indicator of liver injury. The alanine aminotransferase levels were drastically decreased in HFD-fed *Spp1*-KO mice compared with Wt mice (Figure 6A). In addition, *Spp1*-KO mice with obesity showed significantly less liver steatosis and hepatic triglyceride contents compared with Wt mice with obesity (Figure 6B-D). As we previously reported in a mouse model of MAFLD [21], liver expression of *Spp1* increased with the development of liver complications (Figure 6E). The development of liver inflammation was associated with accumulation of macrophages, DCs, and T cells as assessed by the expression of *Emr1*, *Itgax*, and *Cd3e*, respectively (Figure 6E,F). The expression of proinflammatory/Th1 cytokines, including interferon gamma (*Ifng*), *Il12b*, and tumor necrosis factor- α (*Tnf*), was also upregulated in Wt mice with obesity (Figure 6F). Although no significant differences were found in the expression of T-cell marker *Cd3e* and macrophage marker *Emr1*, the expression levels of *Itgax*, *Ifng*, *Il12b*, and *Tnf* were drastically decreased in HFD-fed *Spp1*-KO mice compared with HFD-fed Wt mice (Figure 6E,F). Altogether, our results show that SPP1 plays an important role in the onset of MAFLD (liver steatosis, injury, and inflammation) by regulating AT and liver inflammation.

Liver SPP1 expression increased with MAFLD severity and correlated with T-cell marker expression in patients with obesity

Finally, we examined the relationship between hepatic SPP1 expression and MAFLD in human liver biopsies from patients with severe

obesity after bariatric surgery (independent group of SCAT patients). Liver patients ("liver group") were classified into three groups: those without MAFLD, those with hepatic steatosis, and those with metabolic steatohepatitis (NASH) (on the basis of histopathological features; Table 1). Liver mRNA levels of *SPP1* progressively increased with hepatic steatosis and then NASH. Interestingly, liver mRNA levels of *CD3* and *CD8* (but not *CD4*) were strongly upregulated with NASH (Figure 7A). *SPP1* expression also correlated with hepatic expression of *CD3* and *CD8* (Figure 7B). Consistent with our animal studies, liver expression of *SPP1* could be a local marker of hepatic inflammation (more related to *CD8* T-cell accumulation) in participants with MAFLD.

DISCUSSION

SPP1 is involved in many biological and pathological processes such as bone turnover, inflammation [33], and liver complications [34–38]. Previous studies have shown that SPP1 is involved in complications associated with obesity. Indeed, SPP1 deficiency or neutralization by antibodies reduces macrophage accumulation in AT, as well as inflammation, IR, and hepatic steatosis associated with obesity [11, 17, 19, 20]. Silencing of *Spp1* in AT macrophages also reduces inflammation and improves glucose tolerance in mice with obesity [39]. However, limited data are currently available on the role of SPP1 in T cells in this context.

The evaluation of gene expression of *SPP1* and markers of immune cells in SCAT of lean participants and those with euglycemia or diabetes and obesity highlights a progressive increase in *SPP1* with obesity and then with IR. Significant upregulation of markers of T cells (*CD4*, *CD8A*) occurs with the severity of IR. In addition, *SPP1* expression strongly correlates with the expression of these markers (Figure 1). The T-cell accumulation in SCAT of participants with diabetes is also associated with increased infiltration of macrophages (as assessed by *CD68* expression) and DCs (as evaluated by *CD1C* expression), which also correlates with *SPP1* expression (Supporting Information Figure S2). While this important link between SPP1, IR, and macrophage enrichment in human AT is consistent with the literature [11, 21], we here report that the upregulation of SPP1 in AT is also related to T-cell accumulation. Interestingly, the beneficial effects of weight loss on tissue insulin sensitivity and inflammation were also associated with decreased expression of *SPP1*, *CD8A*, and *CD68* in human SCAT.

To further investigate the role of SPP1 in these responses, we investigated the consequences of *Spp1* deficiency in HFD-fed mice. As previously reported in two independent studies [11, 20], HFD-induced obesity is equivalent in both mouse strains (Wt and *Spp1*-KO mice). A previous study also reported that *Spp1* deficiency does not affect body composition and energy expenditure in a HFD-fed mouse model [11]. However, *Spp1*-KO mice with obesity have less IR than Wt mice with obesity (as evaluated by glucose tolerance and a lower fed insulin level). These beneficial effects on IR are in line with previous reports [11, 17, 32]. Furthermore, our results suggest prevention of AT IR in *Spp1*-KO mice upon HFD challenge (assessed by

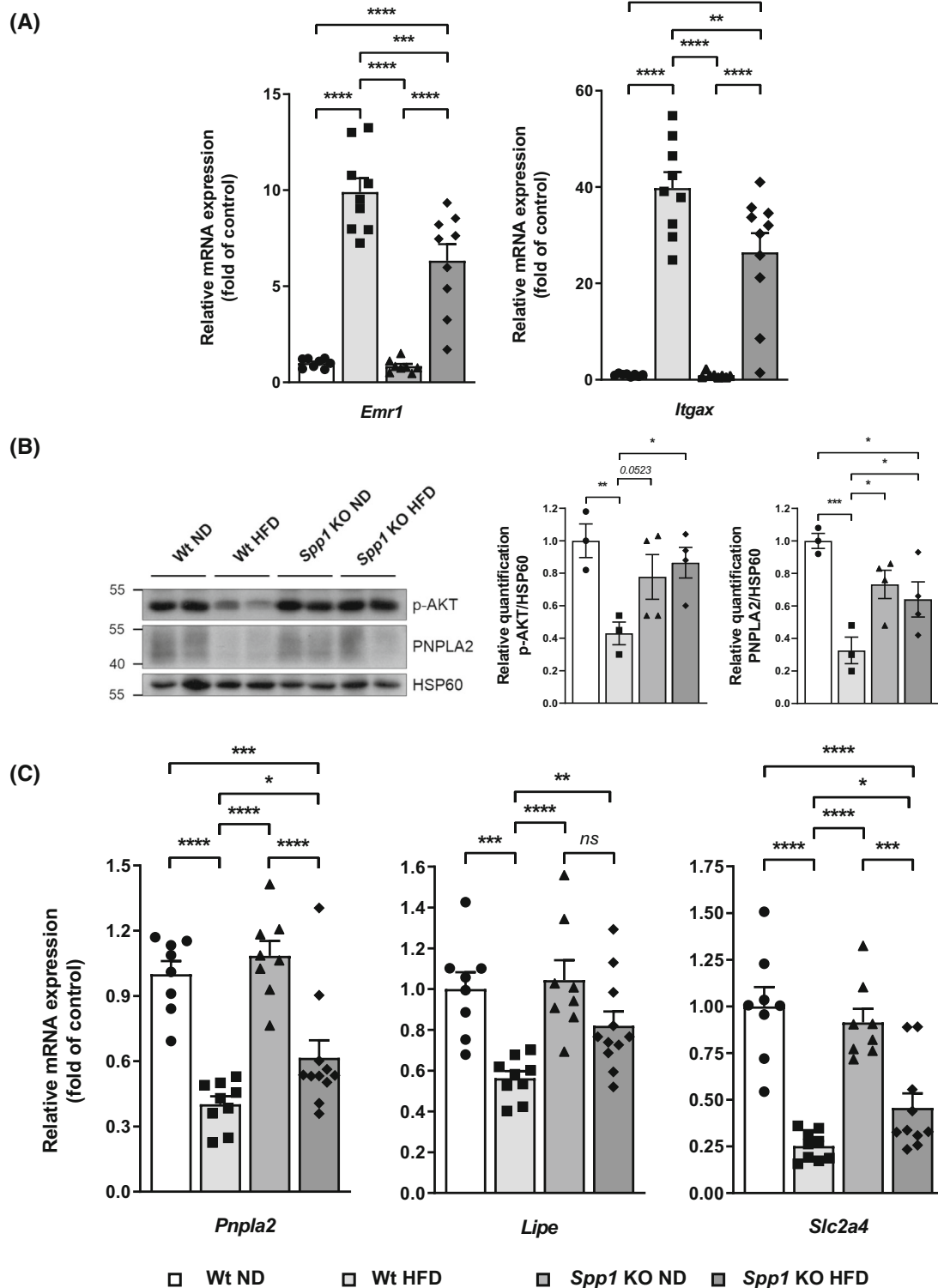


FIGURE 5 SPP1 deficiency prevents epididymal white adipose tissue (eWAT) inflammation and insulin resistance upon high-fat diet (HFD) challenge. (A, C) eWAT mRNA expression levels of markers of macrophages (*Emr1*), dendritic cells (*Itgax*), lipid mobilization (*Pnpla2*, *Lipe*), and glucose transport (*Slc2a4*) were analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction in wild-type (Wt) mice fed with normal diet (ND; $n = 8$) or HFD ($n = 9$) and *Spp1*-knockout (KO) mice fed with ND ($n = 8$) or HFD ($n = 11$). Gene expression was normalized to *Rplp0* (also known as *36b4*) mRNA levels. Relative expression levels compared with ND Wt control group are shown. (B) eWAT levels of phospho-AKT (Ser473), PNPLA2, and HSP60 were evaluated at the protein level in Wt-ND ($n = 3$), Wt-HFD ($n = 3$), *Spp1*-KO ND ($n = 4$), and *Spp1*-KO HFD ($n = 4$) mice. Representative samples are shown. Immunoreactive bands were quantified by densitometric scanning analysis, and their intensity was normalized to the amount of total HSP60. Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical differences between groups were analyzed by two-way ANOVA. Post hoc comparisons were performed using Benjamini, Krieger, and Yekutieli correction. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, and **** $p < 0.0001$

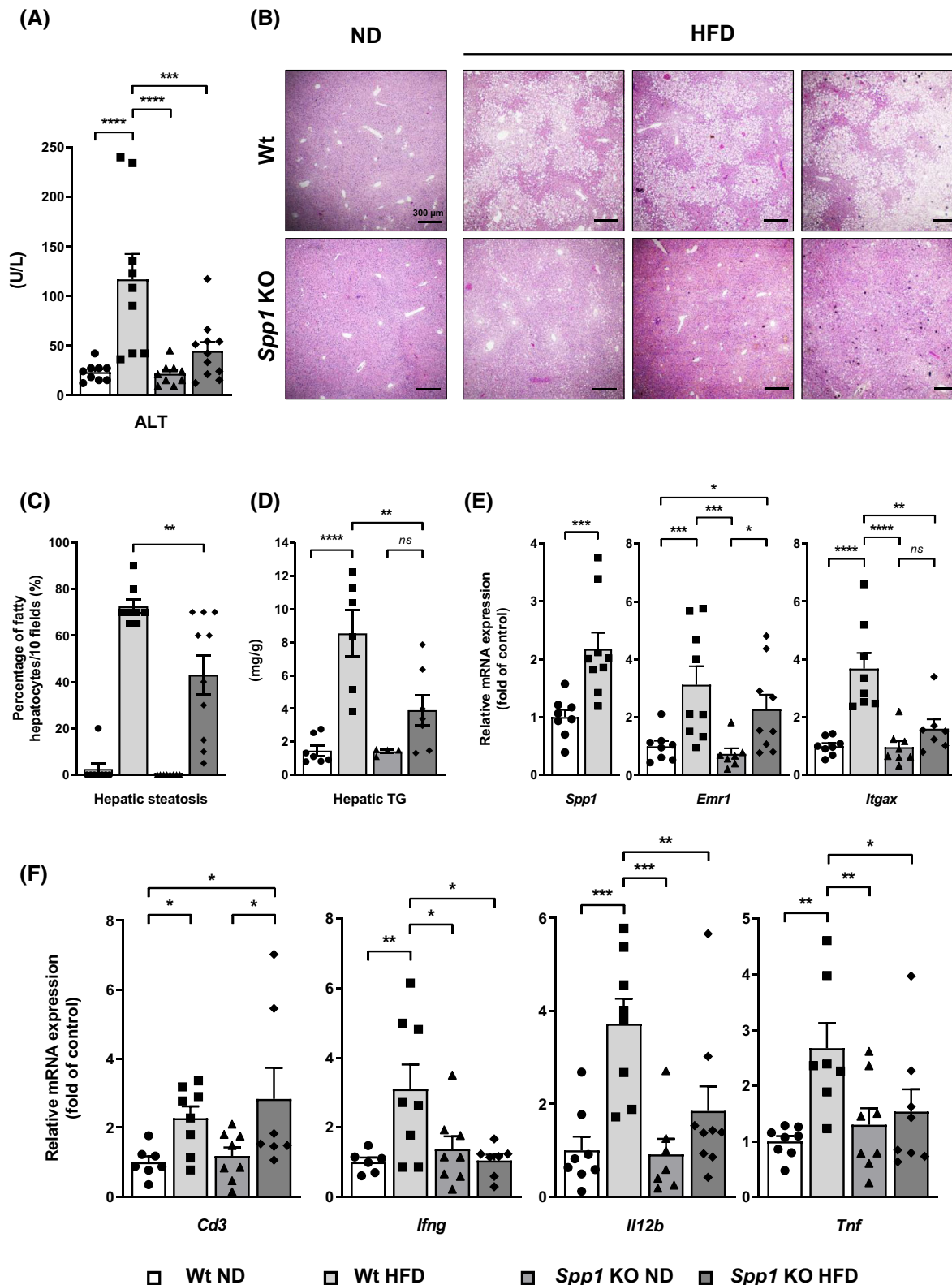


FIGURE 6 SPP1 deficiency prevents high-fat diet (HFD)-induced liver injury, steatosis, and inflammation (Th1 response). Wild-type (Wt) and *Spp1*-knockout (KO) mice were fed a normal diet (ND) or HFD. (A) Plasma levels of ALT were evaluated after 25 weeks of ND or HFD (9–11 mice per group). (B, C) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of liver samples from Wt and *Spp1*-KO after 33 weeks of ND or HFD as indicated. (B) Typical pictures are shown. (C) Quantification of hepatic steatosis evaluated by the percentage of fatty hepatocytes per 10 fields (8–10 mice per group). (D) Liver triglyceride content from Wt and *Spp1*-KO after 33 weeks of ND or HFD (4–7 mice per group). (E, F) Liver mRNA expression levels of *Spp1*, *Emr1*, *Ilgax*, *Cd3e*, *Ilgf*, *Il12b*, and *Tnf* were analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction. Gene expression was normalized to *Rplp0* (also known as *36b4*) mRNA levels. Relative expression levels compared with ND Wt control group are shown (6–9 mice per group). Results are expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA was performed to determine statistical differences. Post hoc comparisons by Benjamini, Krieger, and Yekutieli correction method were used. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, and **** $p < 0.0001$. ALT, alanine aminotransferase; TG, triglyceride

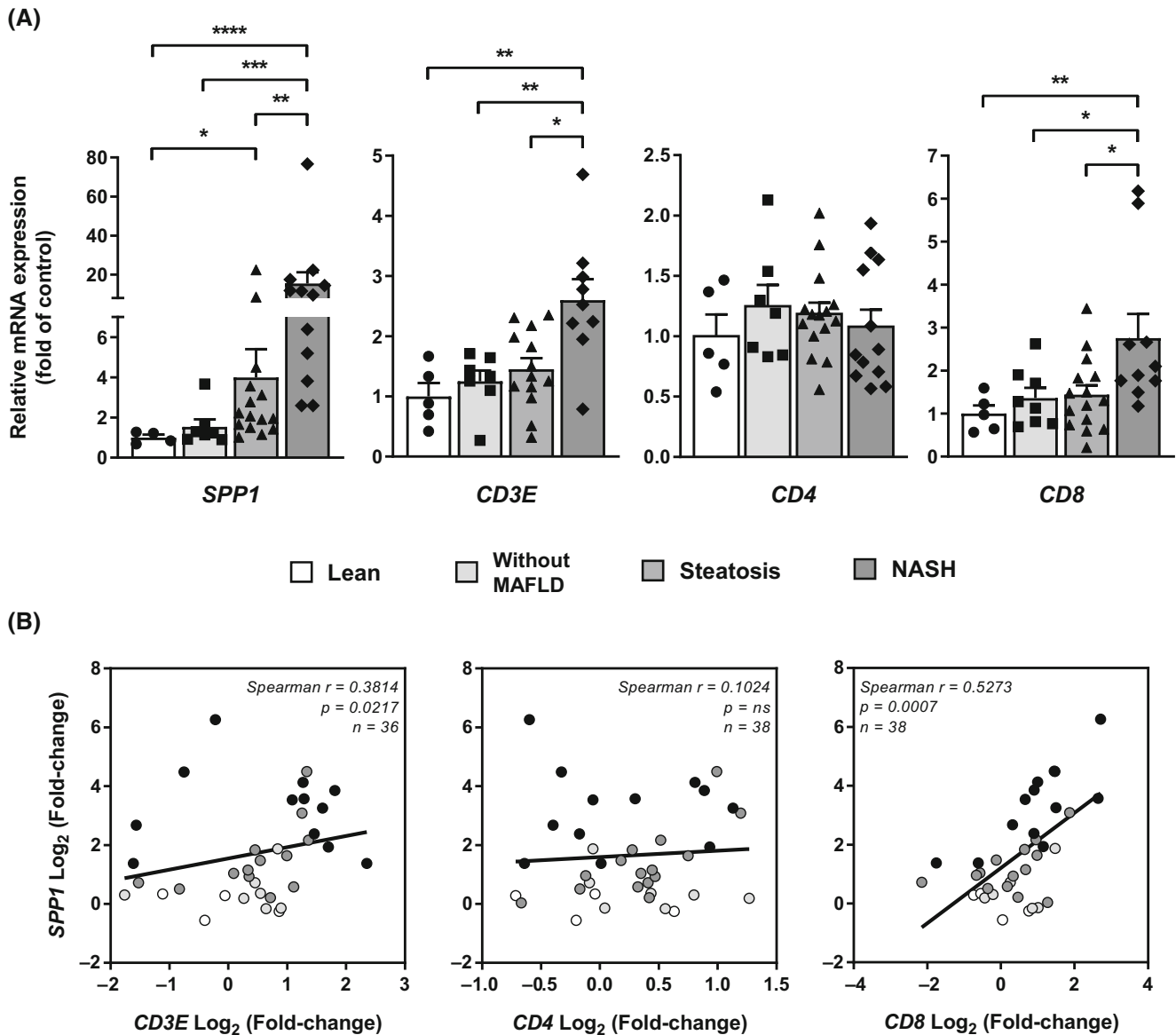


FIGURE 7 Liver expression of *SPP1* correlates with T-cell markers *CD3* and *CD8* in human individuals with metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD). Liver *SPP1*, *CD3E*, *CD4*, and *CD8A* mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction in lean participants ($n = 4$) and in participants with obesity without MAFLD ($n = 8$), with hepatic steatosis ($n = 15$), and with nonalcoholic steatohepatitis (NASH; $n = 12$). Gene expression was normalized to the mRNA levels of *RPLP0*. (A) Results are expressed relative to expression levels in lean participants (mean \pm SEM) and statistically analyzed by one-way ANOVA. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, and **** $p < 0.0001$. (B) Correlations between liver *SPP1* expression (fold change) and liver expression of *CD3E*, *CD4*, and *CD8A* were analyzed using Spearman correlation test.

decreased phospho-AKT and PNPLA2). Of interest, a previous study clearly demonstrated, using a hyperinsulinemic euglycemic clamp approach, that the absence of *SPP1* indeed confers protection against the development of AT IR during obesity [32].

Nomiyama et al. associated these beneficial effects with a reduction in macrophage numbers in AT [11]. Similarly, *SPP1* neutralization with specific antibodies partially corrects inflammation, IR, and macrophage accumulation in AT in mice with obesity [17]. However, it has been established that T-cell dysregulation (increased proinflammatory Th1 cells and reduced Tregs in AT) could precede macrophage accumulation during the development of IR [12, 13]. T-cell activity is also required for establishment of chronic low-grade inflammation associated with

obesity. We here demonstrate that *Spp1* deficiency strongly reduces the accumulation of T cells (*CD4* and *CD8* T cells) into eWAT in mice with obesity. In addition, *Spp1* deficiency decreases frequency of proinflammatory Th1 *CD4* T cells (IFN γ ⁺*CD4*⁺ T cells) and increases the number of Tregs (FOXP3⁺*CD4*⁺ T cells) compared with *Wt* mice with obesity.

Although levels of circulating *SPP1* are slightly elevated in mice with obesity (Supporting Information Figure S4B), local mRNA and protein expression of *SPP1* in AT (Figure 4A) is strongly elevated and directly related to T-cell accumulation in mice with obesity compared with lean mice. AT *SPP1* levels do not correlate with plasma levels (Supporting Information Figure S4C). We have previously reported

this discrepancy in SPP1 levels between SCAT and blood in human individuals with obesity [21].

In liver, *Spp1* and T-cell marker *Cd3* are also increased with hepatic steatosis in HFD-fed Wt mice, but *Cd3* expression remains unchanged with SPP1 deficiency. It is also important to notice that the *Spp1* increase is much lower than observed in AT. SPP1 deficiency in HFD-fed mice strongly reduces the expression of Th1 cytokines including *Ifn γ* , *Il12b*, and *Tnf* without impacting *Cd3* expression. These results may indicate that hepatic SPP1 is unlikely to contribute to T-cell accumulation in fatty liver, but that it may participate in the regulation of immune cell functions. In addition to decreased Th1 cytokines, the absence of SPP1 is also associated with decreased expression of macrophage (*Emr1*) and DC (*Iltgax*) markers. To address the potential link between SPP1 and lymphocytes in human MAFLD, we evaluated its expression as well as that of immune cell markers in participants with obesity and NASH versus participants with obesity and liver steatosis or without MAFLD. In participants with NASH, CD4 expression is unchanged. In contrast, the expression of markers of T cells (CD3), CD8 T cells (CD8A), macrophages (CD68), and DCs (CD1C) increases with NASH (Figure 7 and Supporting Information Figure S5). SPP1 expression progressively increases with steatosis, and then NASH, and correlates with CD3, CD8A, and CD1C expression (Figure 7 and Supporting Information Figure S5).

The CD4 T-cell polarization in AT and liver plays a key role in the chronicity of inflammation associated with obesity. In mice with obesity, AT accumulation of DCs, required for T-lymphocyte polarization, could result in increased recruitment from blood and/or differentiation from AT monocytes. The decreased AT DCs in HFD-fed *Spp1*-KO mice compared with Wt mice seems to be more dependent on DC recruitment. Indeed, SPP1 is dispensable for the differentiation and maturation of DCs from monocytes *in vitro* (Supporting Information Figure S6). While the expression of *Spp1* is strongly increased during differentiation of DCs from bone marrow monocytes, *Spp1* deficiency impacts neither the proportion of CD11b^{high}CD11c^{high} bone marrow-derived dendritic cells upon granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/IL-4 treatment nor their maturation in response to lipopolysaccharide (major histocompatibility complex class II^{high}CD86^{high} DCs) (Supporting Information Figure S6). However, we cannot rule out the potential regulation of DC activity by SPP1 in a context of organ immune microenvironment. In any case, SPP1 can trigger Th1 polarization of T cells. We here report that (i) IFN γ ⁺CD4⁺ T-cell frequency is reduced in eWAT of HFD-fed *Spp1*-KO mice compared with Wt mice; (ii) IFN γ production in response to α CD3/CD28 antibodies is lower in eWAT-derived *Spp1*-KO T cells versus Wt T cells; and (iii) hepatic levels of Th1 cytokines (*Ifn γ* , *Il12b*, *Tnf*) are strongly reduced in absence of SPP1 after HFD challenge. Consistent with the role of SPP1 in Th1 polarization of T cells, it was shown that overexpression of SPP1 in hepatocytes under the control of the serum amyloid P component promoter is sufficient to drive the onset of hepatitis with an increased Th1 polarization and an enrichment of CD8 T cells after 12 weeks [40]. The link between SPP1 and Th1 pathway also was demonstrated *in vitro* and in mouse models of bacterial and viral infection [33]. In addition, *Spp1* gene expression in activated T cells is regulated by T-bet, a transcription factor that controls CD4⁺ Th1 cell

lineage commitment. T-bet-dependent expression of *Spp1* in T cells is essential for efficient skewing of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells toward Th1 and type 1 CD8⁺ T-cell (Tc1) pathway, respectively [41]. Accumulation of a particular CD4⁺ T-cell population (CD153⁺PD-1⁺CD44^{hi}CD4⁺ T cells) in VAT of HFD-fed mice causes VAT inflammation by producing large amounts of SPP1. These T cells possess characteristics of cellular senescence [42]. Absence of SPP1 in T cells could also prevent accumulation of senescent-like T cells and chronic local inflammation.

Some limitations in our study must be noted. Our preclinical study has been based on global deficiency of SPP1. Because macrophages, preadipocytes, and T cells should be the main sources of SPP1 in AT, the impact of SPP1 deficiency in myeloid and lymphoid cells (e.g., CD153⁺PD-1⁺CD44^{hi}CD4⁺ T cells) on AT inflammation, IR, and T-cell accumulation and polarization should be investigated in the future. Interestingly, the silencing of SPP1 in eWAT macrophages via small interfering RNA improves glucose tolerance in mice with obesity [39].

In conclusion, SPP1 plays an important role in the development of chronic inflammation by regulating T-cell infiltration (mainly in AT) and polarization (in AT and liver). In preclinical models, targeting SPP1 through deficiency can partially prevent AT inflammation and IR. In human individuals, the AT expression of SPP1 increases with AT inflammation and contributes to early accumulation of Th1 T cells preceding macrophage infiltration. By regulating AT inflammation and IR, SPP1 could also enhance the development of hepatic steatosis and injury and of NASH. Because SPP1 is also expressed in other liver cells and it predicts liver fibrosis in other chronic liver diseases [35], studies focusing on its specific cell targeting should provide more insight into the pathogenesis of T2D and MAFLD.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PG, CL, FS, DR, and CL designed the research and wrote the paper. FS, DR, SB, SP, JM, MB, AS, and MAF performed the experiments. AI, AT, and RA contributed to human sampling and data collection. All authors edited and approved the final submitted draft.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors extend their thanks (i) to the INSERM-U1065 animal facility staff and Dr. Véronique Corcelle, (ii) to the INSERM-U1065 flow cytometry platform, and (iii) to Catherine Buchanan from the Office of International Scientific Visibility for comments on the English version of the manuscript.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by grants from INSERM (France) and charities (Association Française pour l'Etude du Foie [AFEF] to PG and CL; La Société Nationale Française de Gastro-Entérologie [SNFGE]-FARE to RA). This work was also funded by the "Investments for the Future" LabEx SIGNALIFE (#ANR-11-LABX-0028-01) and the UCA^{JEDI} Investments in the Future project (#ANR-15-IDEX-01). FS, MB, and AS were supported by the French Government (National Research Agency, ANR) (#ANR-19-CE14-0044-01, #ANR-18-CE14-0019-02, and #ANR-22-CE14-0027-01, respectively).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declared no conflicts of interest.

ORCID

Philippe Gual  <https://orcid.org/0000-0001-7393-8356>

REFERENCES

- Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement. *J Hepatol*. 2020;73:202-209.
- Riazi K, Azhari H, Charette JH, et al. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2022;7:851-861.
- Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*. 2011;378:804-814.
- Luci C, Bourinet M, Leclère PS, Anty R, Gual P. Chronic inflammation in non-alcoholic steatohepatitis: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:597648. doi: [10.3389/fendo.2020.597648](https://doi.org/10.3389/fendo.2020.597648)
- Tordjman J, Poitou C, Hugol D, et al. Association between omental adipose tissue macrophages and liver histopathology in morbid obesity: influence of glycemic status. *J Hepatol*. 2009;51:354-362.
- Chavakis T, Alexaki VI, Ferrante AW. Macrophage function in adipose tissue homeostasis and metabolic inflammation. *Nat Immunol*. 2023;24:757-766.
- Kamei N, Tobe K, Suzuki R, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem*. 2006;281(26602-26):614-26614.
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. 2006;116:1494-1505.
- Patsouris D, Li PP, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab*. 2008;8:301-309.
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest*. 2006;116:115-124.
- Nomiyama T, Perez-Tilve D, Ogawa D, et al. Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest*. 2007;117:2877-2888.
- Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009;15:930-939.
- Winer S, Chan Y, Paltser G, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med*. 2009;15:921-929.
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009;15:914-920.
- Kintscher U, Hartge M, Hess K, et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1304-1310.
- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13. doi: [10.12703/P6-13](https://doi.org/10.12703/P6-13)
- Kiefer FW, Zeyda M, Gollinger K, et al. Neutralization of osteopontin inhibits obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Diabetes*. 2010;59:935-946.
- Bertola A, Ciucci T, Rousseau D, et al. Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes*. 2012;61:2238-2247.
- Kiefer FW, Neschen S, Pfau B, et al. Osteopontin deficiency protects against obesity-induced hepatic steatosis and attenuates glucose production in mice. *Diabetologia*. 2011;54:2132-2142.
- Kiefer FW, Zeyda M, Todoric J, et al. Osteopontin expression in human and murine obesity: extensive local up-regulation in adipose tissue but minimal systemic alterations. *Endocrinology*. 2008;149:1350-1357.
- Bertola A, Deveaux V, Bonnafous S, et al. Elevated expression of osteopontin may be related to adipose tissue macrophage accumulation and liver steatosis in morbid obesity. *Diabetes*. 2009;58:125-133.
- Cantor H, Shinohara ML. Regulation of T-helper-cell lineage development by osteopontin: the inside story. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:137-141.
- Kahles F, Findeisen HM, Bruemmer D. Osteopontin: a novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab*. 2014;3:384-393.
- Wanko B, Tardelli M, Jürets A, et al. Antibody-mediated targeting of cleavage-specific OPN-T cell interactions. *PLoS One*. 2019;14:e0214938. doi: [10.1371/journal.pone.0214938](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214938)
- Patouraux S, Rousseau D, Bonnafous S, et al. CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2017;67:328-338.
- Anty R, Morvan M, Le Corvec M, et al. The mid-infrared spectroscopy: a novel non-invasive diagnostic tool for NASH diagnosis in severe obesity. *JHEP Rep*. 2019;1:361-368.
- Bekri S, Gual P, Anty R, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*. 2006;131:788-796.
- Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*. 2004;27:1487-1495.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41:1313-1321.
- Lumeng CN, Maillard I, Saltiel AR. T-ing up inflammation in fat. *Nat Med*. 2009;15:846-847.
- Park C-S, Shastri N. The role of T cells in obesity-associated inflammation and metabolic disease. *Immune Netw*. 2022;22:e13. doi: [10.4110/in.2022.22.e13](https://doi.org/10.4110/in.2022.22.e13)
- Chapman J, Miles PD, Ofrecio JM, et al. Osteopontin is required for the early onset of high fat diet-induced insulin resistance in mice. *PLoS One*. 2010;5:e13959. doi: [10.1371/journal.pone.0013959](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013959)
- Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*. 1979;200(287):860-864.
- Syn W-K, Choi SS, Liaskou E, et al. Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2011;53:106-115.
- Patouraux S, Bonnafous S, Voican CS, et al. The osteopontin level in liver, adipose tissue and serum is correlated with fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One*. 2012;7:e35612. doi: [10.1371/journal.pone.0035612](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035612)
- Patouraux S, Rousseau D, Rubio A, et al. Osteopontin deficiency aggravates hepatic injury induced by ischemia-reperfusion in mice. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1208. doi: [10.1038/cddis.2014.174](https://doi.org/10.1038/cddis.2014.174)
- Wen Y, Jeong S, Xia Q, Kong X. Role of osteopontin in liver diseases. *Int J Biol Sci*. 2016;12:1121-1128.
- Song Z, Chen W, Athavale D, et al. Osteopontin takes center stage in chronic liver disease. *Hepatology*. 2021;73:1594-1608.
- Aouadi M, Tencerova M, Vangala P, et al. Gene silencing in adipose tissue macrophages regulates whole-body metabolism in obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:8278-8283.
- Mochida S, Yoshimoto T, Mimura S, et al. Transgenic mice expressing osteopontin in hepatocytes as a model of autoimmune hepatitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;317:114-120.
- Shinohara ML, Jansson M, Hwang ES, Werneck MBF, Glimcher LH, Cantor H. T-bet-dependent expression of osteopontin contributes to T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102:17101-17106.

42. Shirakawa K, Yan X, Shinmura K, et al. Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue. *J Clin Invest*. 2016;126:4626-4639.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Soysouvanh F, Rousseau D, Bonnafous S, et al. Osteopontin-driven T-cell accumulation and function in adipose tissue and liver promoted insulin resistance and MAFLD. *Obesity (Silver Spring)*. 2023;31(10):2568-2582. doi:[10.1002/oby.23868](https://doi.org/10.1002/oby.23868)

Résumé

Contribution des cellules innées lymphoïdes NKp46⁺ et régulation de leurs fonctions par CD44 au cours de la stéatohépatite métabolique.

La maladie hépatique stéatotique associée à un dysfonctionnement métabolique (MASLD) est l'une des principales causes de maladies chroniques du foie avec une prévalence mondiale de 33% en 2022. La MASLD regroupe un spectre de lésions hépatiques allant de la stéatose, (accumulation de lipides dans les hépatocytes) vers la stéatohépatite associée au métabolisme (MASH), caractérisée par une inflammation et une mort hépatocytaire. La MASH est la forme évolutive de la maladie qui peut progresser vers des stades plus sévères comme la fibrose/ cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Des acteurs intrahépatiques (cellules immunitaires) et extrahépatiques (tissu adipeux et intestin) contribuent au développement de la MASLD. Actuellement, il n'existe pas/ou peu de thérapies efficaces, ni de biomarqueurs pour traiter ou prévenir la MASLD. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques représente un enjeu majeur pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les cellules innées lymphoïdes (ILC) regroupent un ensemble de 5 populations cellulaires. Parmi elles, les cellules *natural killer* (NK) et les ILC1 auxiliaires représentent l'une des premières lignes de défense de l'organisme. De nombreuses études ont mis en évidence la contribution des ILC dans le développement des maladies métaboliques (obésité, diabète, MASLD) en régulant l'inflammation au sein des tissus cibles : tissu adipeux, foie, intestin. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au ciblage des cellules NK/ILC1 au cours de la MASLD car ces cellules sont impliquées dans la mise en place et/ou la résolution des processus inflammatoires, fibrotiques et tumoraux. Nous avons porté notre attention sur la glycoprotéine de surface CD44 connue pour ses rôles dans les interactions, l'adhésion, la migration et l'activation cellulaire. Notre équipe a mis en évidence un rôle clé de CD44 dans la progression de la MASH en permettant aux macrophages d'acquérir un phénotype pro-inflammatoire. Afin de mieux comprendre le rôle des cellules NK/ILC1 et de CD44 dans les complications hépatiques de l'obésité, nous avons généré un modèle murin d'inactivation spécifique de CD44 au sein des cellules NK et ILC1 (souris NKp46⁺iCre CD44^{flox}). Ainsi, les objectifs de ma thèse ont été d'évaluer : i) l'impact de l'inactivation spécifique de CD44 au sein des ILC NKp46⁺ sur le développement de la MASLD et sur la dynamique des cellules NK /ILC1 dans deux modèles alimentaires inducteurs de MASH/MASLD (régime déficient en choline et méthionine, régime occidental) ; ii) l'impact de l'inactivation spécifique de CD44 sur les fonctions des cellules NK et ILC1 ; iii) le métabolisme des cellules NK invalidées pour CD44. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une corrélation entre le nombre de cellules NK/ILC1 hépatiques avec la souffrance hépatocytaire au cours de la MASH. De plus, l'inactivation spécifique de CD44 au sein des cellules NK/ILC1 régule leur proportion et conduit à une aggravation de la souffrance hépatique, de l'inflammation et de la fibrose. La gravité de ces lésions est notamment associée à une augmentation de la perméabilité intestinale. L'activation des cellules NK hépatiques déficientes pour CD44 par le LPS induit une augmentation de leur capacité glycolytique, de l'expression/sécrétion de cytokines inflammatoires et favorise également la production de médiateurs inflammatoires par les hépatocytes. Mes travaux de thèse suggèrent que CD44 est un régulateur d'une partie des fonctions des cellules NK hépatiques et son absence au sein de ces cellules contribue au développement de la maladie. Notre étude permet de mieux comprendre la physiopathologie de la MASLD et suggère que le ciblage des fonctions des cellules NK représente un axe d'étude pour le développement d'approches thérapeutiques pour prévenir/traiter les complications hépatiques associées à l'obésité.

Mots clés : Cellules innées lymphoïdes, cellules NK, ILC1, foie, MASH, métabolisme.