Thèse de Doctorat

de

l'Université Paris Descartes

Ecole doctorale BioSPC

Département Biologie Cellulaire et Moléculaire, Physiologie, Physiopathologie

Rôle de la MAP Kinase p38α au cours d'une agression aiguë du foie

Par Manon Fortier

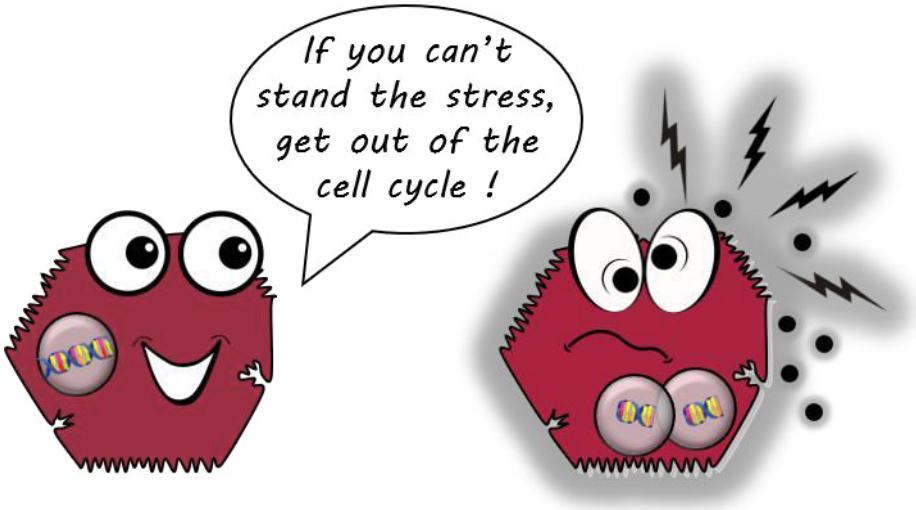
Présentée et soutenue publiquement le 7 Novembre 2018

Devant un jury composé de :

Rapportrice	Mme Sophie CONCHON	CR-HDR – Université de Nantes
Rapporteur	M. Michel SAMSON	DR – Université de Rennes 1
Examinatrice	Mme Hélène GILGENKRANTZ	DR – Université Paris Diderot
Examinateur	M. Thierry TORDJMANN	DR – Université Paris Sud
Directrice de thèse	Mme Séverine CELTON-MORIZUR	CR-HDR – Université Paris Descartes

Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées.

Marie Curie



(D'après *forbetterscience.com*)

REMERCIEMENTS

Cette expérience, qu'a été ma thèse pendant ces quatre années (et un peu plus), n'a pas vraiment été un long fleuve tranquille. Alors que le chemin le plus court entre deux points est normalement une ligne droite, le parcours pour atteindre la ligne d'arrivée a tout compte fait été plutôt tortueux. Je souhaite sincèrement remercier les nombreuses personnes qui m'ont finalement permis d'y parvenir.

En premier lieu, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse : Madame Sophie Conchon et Monsieur Michel Samson, en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse et de faire le déplacement depuis Nantes et Rennes afin d'assister à ma soutenance de thèse, et Madame Hélène Gilgenkrantz et Monsieur Thierry Tordjman en tant qu'examinateurs de ce travail.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à Madame Séverine Celton-Morizur, ma directrice de thèse. Après m'avoir initiée aux joies de la très célèbre et prometteuse p53 en master 2, c'est finalement sur la fameuse MAP Kinase p38 que nous avons dû jeter notre dévolu. La partie n'a pas été de tout repos mais je crois que nous avons réussi à nous adapter l'une à l'autre et composer cette partition à quatre mains. Merci de m'avoir accordé ta confiance pour cette aventure, même si tu as dû passer l'HDR en retour. J'espère que j'ai accompli ma mission en tant que « première doctorante ». Tu as été là pour répondre à mes si nombreuses questions existentielles, comme je les appelle, toujours plus farfelues les unes que les autres. Je souhaiterai aussi te remercier pour ton immense capacité de compréhension d'un point de vue professionnel mais aussi personnel. Un grand merci pour tout ce que tu as fait.

Je souhaite également remercier Madame Chantal Desdouets, directrice de l'équipe. Comme tu me le disais si bien, j'espère avoir su mettre les œufs dans plusieurs paniers et finalement su prendre le taureau par les cornes. Même si cela n'est pas toujours agréable de se faire réprimander, tu as su me redonner de la motivation dans les moments de creux. Merci aussi de m'avoir donné l'opportunité de participer au projet ARID1A, riche d'enseignement, et qui m'a permis de pouvoir également prendre du recul par rapport à p38.

Jean-Pierre, merci pour ton aide précieuse sur ce projet. Pas facile de se lancer dans un domaine si obscur que celui de l'immunologie mais tu as su nous rassurer et nous conseiller à chaque étape et résultat. Merci de m'avoir soutenue à chaque instant.

Mathilde, un immense merci pour ton implication dans ce projet. Il est certain que sans toi nous ne serions pas arrivées là. Merci pour ta patience parce qu'il faut avouer que côté immuno je ne connaissais vraiment pas grand-chose et que j'ai eu un certain nombre de questions. J'ai apprécié découvrir ton univers, ta voix rauque du matin très tôt, suivi de la pause pendant la centri du percoll, mais aussi les fins de journée au FACS, tant de moments pour des discussions aux sujets invraisemblables et des danses improvisées. Tu as toujours eu de l'enthousiasme après les analyses malgré les résultats discordants et m'a donné une raison de plus d'y croire. Madoux, tu es aussi ce petit bout de femme « nature peinture » qui fait des expériences capillaires, vit dans un monde plein de licornes, mange des chips à toute heure. Quelle joie de partager ce quotidien, merci !

Je remercie aussi Nadia de m'avoir aidé sur ce projet. Tu as su prendre le relais des marquages et des westerns au pied levé et tu n'as jamais rechigné face à la montagne de manips qui nous attendait le lundi matin. Merci de m'avoir accordé ta confiance au fil de ces jours partagés dans l'aquarium. J'espère sincèrement que tu continueras à t'épanouir comme tu as pu l'être en 5013.

Jocelyne, merci pour ta bienveillance. Nous nous sommes découvertes avec le projet ARID1A où nous avons su être complémentaires. Besoin d'un conseil sur n'importe quelle technique, les commandes, mais aussi sur le jardinage, les chats, les recettes de cuisine, n'hésitez pas, Jocelyne est toujours prête à aider. Je te remercie d'avoir veillé sur moi lors de mes baisses de régime et la vérification du chauffage au sol cochinois. Je te souhaite maintenant de bien profiter de ta retraite à venir pendant laquelle je ne doute pas que tu seras fort occupée.

Maëva, pas facile d'arriver dans cet aquarium mais tu as su t'intégrer tel un caméléon et as apporté un souffle nouveau. Merci d'avoir supporté les traditions de ce bureau avec les mariages le midi et les goûts musicaux souvent discutables. J'espère avoir rempli mon rôle d'ancienne thésarde en te transmettant certains codes. N'oublie pas de t'aérer l'esprit de temps en temps. Je te souhaite le meilleur pour ton futur.

Sandrine, merci pour ta fraicheur ! Sans toi non plus, rien n'aurait été possible. Que ce soit pour des questions métaboliques, de gestion de souris, de perfusion, d'immuno, d'intendance (je pense notamment aux 15 000 séquences d'oligos que j'ai pu te demander de retrouver) ou pour nous aider les matins d'isolation des cellules immunitaires (parce que 14 souris ça fait vraiment beaucoup), tu as répondu présente et toujours avec le sourire. Ça a été un réel plaisir d'échanger avec toi, surtout sur la pâtisserie et ses diverses techniques. Alors gélatine ou agar agar ? Un grand merci !

Romain, l'homme de ses dames. J'ai adoré te taquiner même si j'ai vite appris que tu es un peu rancunier et me l'a rendu au centuple, mais c'était de bonne guerre. Je te remercie pour tous tes conseils sur les manips, ces moments de refuge en alternance dans le bureau de l'un ou de l'autre. Tu savais me trouver si tu voulais manger à une heure raisonnable, nous amenant à des discussions aussi bien complètement délurées que sérieuses. Merci aussi d'avoir supporté mes choix musicaux lorsque je mets la radio dès le matin tôt, très tôt. Tu m'impressionnes par le nombre de projets que tu arrives à mener de front et je suis sûre que ton avenir s'annonce radieux. J'espère sincèrement que nos chemins continueront à se croiser.

Je n'oublie pas non plus ceux qui sont passés par là et repassent de temps en temps.

Marion, la tâche qui t'a été confiée n'était pas évidente mais tu as su relever le défi du Double KO comme il se doit. Je te remercie pour ta bonne humeur, ton franc parlé qui a mis un peu de piment dans cette thèse. Tu fais maintenant ton bonhomme de chemin et je ne doute pas que tu seras un médecin accompli.

Antoine, merci pour tes conseils sur la macro et surtout l'immuno. En espérant que ton passage outre-Atlantique te mène là où tu le souhaites.

Je remercie également Emilie, Sophie, Alex, Hugo, Julien et Angélique que j'ai croisé en Master ou lors de ma thèse. Que de rencontres enrichissantes.

Merci Anne-Marie pour tes multiples conseils sur la culture cellulaire et la biologie moléculaire que tu me préconisais avec ta douceur légendaire. Les discussions avec toi sont un appel au voyage, surtout depuis ton départ à la retraite lorsque tu me racontes les superbes destinations que tu visites.

Myriam, quelle jolie rencontre tu as été lors de cette thèse. Tu m'as tant fait rire avec ton apprentissage de la cuisine et tes apparitions pour la fameuse pause yaourt. Ton optimisme et ta bonne humeur nous amène à entrer dans ton monde coloré de rose où on a envie de se blottir et ne pas le quitter.

Merci aussi à Domichou, qui a tenté de résoudre avec moi le mystère des coupes « gaufrées » grâce à son expertise en histologie. Grâce à toi, le microtome n'a plus aucun secret pour moi. J'ai adoré te découvrir dans ce bureau en 4504 où cette fameuse fenêtre coulissante nous séparait, mais tu arrivais toujours à me surprendre en flagrant délit lorsque je mangeais du chocolat. Qu'il est bon de te revoir quand tu reviens par ici.

Vanessa, par où commencer ? C'est en partageant le bureau des parias que nous nous sommes découvertes. Une fois passé le temps d'adaptation à nous observer du coin de l'œil et vécu les moments de culture, où le silence était de mise parce qu'à 6h30 il ne faut pas trop nous parler avant qu'on ait pris notre petit déj', j'ai compris que je pouvais partager plus que des conseils sur les westerns ou les qPCR. S'en est alors suivi de grands moments de fous rire, de danse (merci d'être rentrée dans mon univers latino), de chants divers et variés (des années 80 à Katy Perry, en passant par les Disney et les comédies musicales), de confidences avec une tasse de thé à la menthe. Je me suis finalement vite reconnue dans la princesse Paillette que tu es, ce qui nous a permis de préparer Noël et les différents évènements cochinois comme il se doit. Nos tentatives de rébellion, bien que se soldant plutôt par un échec, nous ont également rapprochées. Même depuis ta banlieue, cloitrée avec Maïa, tu as continué à me soutenir et à être présente dès que j'avais une question ou un commentaire. J'espère de tout cœur que nous continuerons nos déjeuners improvisés, nos débriefings décos/DIY et bien plus. Un énorme merci pour tout ça et le reste aussi.

Merci à cette fabuleuse équipe avec qui il a été bon de partager sa folie et d'avoir rendu cette aventure plus légère et pétillante.

Ce projet m'ayant amené sur des terrains que je connaissais peu, elle n'aurait pas pu aboutir sans l'aide fondamentale et les précieux conseils d'autres membres de l'Institut.

Merci à Matthieu et Coline pour la gestion des lignées. Coline, tu savais combien manipuler les souris m'était quelque peu compliqué et tu as toujours été là pour m'aider. Matthieu, ces moments passés à essayer de comprendre « le vivant » et pallier au manque de portées nous ont aussi permis de refaire le monde, toujours dans la bonne humeur et de quoi bien commencer une journée.

Le groupe de Sabine Colnot, indispensable à mes pauses café mais pas que (oui, pour le prêt du scanner aussi). Merci de m'avoir toujours accueillie à bras ouverts.
Angé, présente depuis mes débuts. Merci d'avoir toujours été là pour me conseiller. S'il existait, tu aurais haut la main le diplôme d'enseignement de la perfusion hépatique. Notre passion commune pour la danse et les spectacles, nous a amené à des discussions endiablées que j'ai tellement appréciées.
RoRo, ou devrais-je maintenant dire Docteur Riou d'Amour. Je t'admire d'avoir su concilier tous les à-côtés et ta thèse, et ça toujours avec de l'énergie à revendre. Je t'ai tant embêté avec le projet ARID1A, merci d'avoir eu l'infinie patience de répondre à mes questions. Quelle belle personne tu es. Je te souhaite de continuer à réaliser tes rêves.

Cécile, tu savais que me voir arriver rimait avec déchets chimiques. Après avoir cherché les bons couvercles allant sur les sceaux, nos excursions au sous-sol nous ont aussi permis d'échanger.
Merci à Robin (heureusement que tu étais là pour dénicher les bonnes adresses de Lyon), Christèle, Simonetta, Sandra, Julie de m'avoir supportée lors de mes nombreuses apparitions en 4504.

Merci également à Pascalette d'avoir essayé de comprendre avec moi cette maudite accumulation de lipides. Après plusieurs tests, nous savons à quoi nous ne pouvons pas l'attribuer mais toujours pas certaines de à quoi cela pourrait être dû. Merci du temps que tu y as consacré et d'avoir amélioré mes connaissances métaboliques. Les discussions avec toi sont toujours très enrichissantes.
Mathilde, nos tests DHE et le GFF m'ont permis de mieux te découvrir. Je te remercie de tes conseils sur le stress oxydant, tellement complexe, et te souhaite une jolie thèse.
Coco, j'ai comme l'impression que nous nous sommes embarquées sur le même bateau. Tu m'impressionnes par ta combativité, jamais en manque d'idées pour trouver des solutions. Je te souhaite un bel avenir.
Marie, j'ai adoré jouer à l'apprenti vidéaste avec toi et qu'est-ce que nous avons pu rigoler. L'aventure Cochin, ce sont aussi tous ces petits détails qui pimentent cette expérience singulière et dont tu fais partie. Merci d'avoir partagé ces moments.
Sans oublier Juju, ton énergie positive était un rayon de soleil. Je me remémore ces moments où tu t'installais dans le bureau et il faut avouer que cela me manque un peu.

Je souhaiterai également remercier Jean-Christophe. Merci de m'avoir tant aidé dans ce projet en m'évitant de traverser tout Paris, me conseillant sur les macrophages, et tant d'autres choses. Nous avons aussi beaucoup ri, partagé nos adresses culinaires, de piscine et nos histoires de voyage. Que de discussions passionnées !

Merci à ceux qui, au détour d'un couloir, ont rendu cette expérience chaleureuse : l'équipe Maire, Maud, Matthieu, Laura, Stéphanie, Phillipe, l'équipe Peyssonnaux, Mariangela, Sabine, Huong, Cyril, Sylvain, l'équipe Bibi, Yohan, Nicolas, Pierre.
Merci aussi aux filles de la plate-forme d'histologie, Maryline, Fabiola et Rachel.
Merci à la plate-forme de génomique, en particulier Angéline.

Je remercie également l'équipe des gestionnaires, Yannig, Nicolas et Patricia, toujours prête à rendre service. Maryse, merci pour ta bonne humeur, d'avoir eu à cœur de m'aider à chaque instant dans mes démarches administratives ou de commandes. Jamais à court d'anecdotes, tu m'as fait voyager à travers le monde. Quel bonheur de t'avoir rencontrée.

Un énorme merci à mes nanas qui sont devenues bien plus que « les filles de la laverie ». Votre présence au quotidien est un réconfort. Que ce soit pour rire, se confier, me conseiller, vous avez toujours été là, mais bien sûr tout en accomplissant notre travail.
Mimi, jamais la langue dans ta poche, tu savais où me trouver pour que je puisse donner mon avis sur ton punch qui nous a tant régalé. Merci pour les fous rire que nous avons partagés.
Jojo, mon esprit t'associe à ce bruit de billes que tu me ramenais telle une Mère Noël. Ta douceur dans ce trio apporte une sérénité certaine. Merci pour tes sages conseils.
Nathy, ma Blonde, nous avons partagé de sacrés moments. Après m'avoir apprivoisée, j'ai trouvé en toi une véritable mère poule. Merci de m'avoir nourrie les matins de culture, d'avoir réparé mes bêtises, d'avoir calmé mes angoisses, de m'avoir fait rire à en pleurer. J'ai hâte que nous nous retrouvions en Vendée.
Merci pour tout.

Il y a aussi ceux qui m'ont supporté en dehors du laboratoire…

Mes AD4, vous ne vous êtes peut-être pas rendus compte à quel point les vendredis soir ont été une bouffée d'oxygène essentielle lors de cette thèse. Bien plus qu'un cours de danse, c'est la famille MDM que je venais retrouver, cet endroit où on peut laisser les soucis sur le parking de Morel quelques heures. Pour tout ce que vous êtes, tout ce que vous m'avez apporté chacun, notre Chrichri nationale, Kinoo, Gaga, Lili, la grande Marie, Chacha, Mimi, Djo, Laulau, Yoyo, Vava, Mélo, Zazou, la Licorne, Méli, mon acolyte Gégé, un immense merci. Je souhaite remercier spécialement mon binôme Mary chérie. Sans un mot et en un regard tu arrives à comprendre mon humeur du jour, merci de m'avoir accompagnée depuis toutes ces années.
Et puisqu'entre nous c'est nous même, est-ce qu'on sait à quel moment il faut saisir la subtilité entre il est tôt dans la journée et il est tard la veille ?

Ganou, soutien de la première heure, je n'ose même pas compter les années de peur de voir apparaitre des cheveux blancs. Nous avons réussi à nous soutenir malgré nos parcours divergents. Merci d'avoir été présente à chaque instant. Je nous souhaite encore de nombreuses années comme ça.

Mes pensées vont aussi à celles qui m'ont accompagnée tout au long de mes années à la fac, Agathe ma copine de danses latines, Amandine la rebelle, Christelle la pâtissière, Chloé pressée mais présente, Joy ma coloc' de Memphis et véritable amie, l'attachante Julie, Laure toujours prête à blaguer, Lisa et ses conseils avisés, Marie et ses Pygmées, la douce Moc, la bienveillante Tamara. Que ce soit autour d'un verre, à se croiser en bas d'Imagine, ces moments passés avec vous m'ont permis de reprendre mon souffle dans cette course effrénée.

Gaétan, le temps où je t'appelais à minuit pour faire un footing me semble si loin. Nous en avons parcouru du chemin depuis, pas toujours facile de trouver le temps, mais tu as continué à m'encourager. Merci pour les attentions, souvent surprenantes mais qui font tellement plaisir, que tu as pu avoir pour me soutenir.

Ludo, pilier indispensable lors de cette thèse. Tu me soutiens depuis Memphis. Nous nous sommes suivis à Cochin où les pauses goûter m'ont été d'un grand réconfort. Ton départ à Jussieu n'a pas empêché de perpétuer ses habitudes que nous avons su compléter par les déjeuners libanais et les découvertes culinaires asiatiques. Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir écoutée/lue quand j'avais (souvent) besoin de râler. Tu as toujours eu une attention pour tigrou. J'espère maintenant qu'il a l'œil vif d'un grand tigre.

Ma p'tite Choupinette, je souhaitais revisiter ces remerciements mais je n'ai pas réussi. C'est donc classiquement que je vais tenter de le faire (heureusement que tu apprécies le traditionnel). Notre histoire a commencé à 10 000 kms d'altitude avec un porte-clef et personne n'aurait parié sur nous, pas même moi. Mais de fil en aiguille, à base de mi-cuits au chocolat, de rochers à la noix de coco, de roulés à la cannelle et de Prinsesstårta (ah oui nous aimons manger ?) nous avons appris à nous connaitre. Après avoir passé l'étape des Etats-Unis, nous sommes finalement devenues « Colocataires Solidaires et Indivisibles », il n'y avait qu'avec toi que je pouvais m'embarquer dans cette aventure tant tu connais mon hyperindépendance. Nous avons survécu au changement de Master, au cours Pasteur, au stage et là encore décrocher deux bourses de l'Ecole Doctorale nous semblait impossible.

Mais puisqu'impossible n'est pas irréalisable, ça aussi nous l'avons fait, ensemble. Que de joies partagées, de caps franchis, nous en sortons grandies et plus fortes. Dédicace à Bobichette, Nounou et Nounet qui y ont contribué et m'ont accueillie comme une des vôtres. Maintenant « Amies Solidaires et Indivisibles », tu es aussi mon a*lter ego*. J'ai toujours pu compter sur toi pour partager ma passion pour l'astrogastronomie, me remonter le moral (supported by Pierre Hermé®), me coacher, me faire rire, partager mes bêtises et ma folie. Après avoir longtemps cherché je n'ai finalement pas mieux que : Merci à l'infini et au-delà.

Je remercie également ma famille, un soutien essentiel et tellement important pour moi.

J'ai une pensée particulière pour les Belleney. Isa tu m'as littéralement vu grandir. Quentin, persévérant, tu n'as jamais baissé les bras, je suis fière de ce lien inexplicable qui nous unit. Vous m'avez tant apporté durant toutes ses années, c'est aussi grâce à vous tout ça.

Merci à JPK qui a cru en moi dès le début et qui m'appelle docteur depuis 10 ans déjà. J'espère que ce moment dont nous avons tant parlé sera à la hauteur.

Merci à mes tantes et oncles, Sylvie et Alain, Christophe, Agnès et Etienne, Jojo et Gilles, à mes cousins, Margot, Solène, Chloé, Romane, Lauriane, Paul, Alexis, Aymeric et Amélie, d'avoir eu un mot, une attention, d'être toujours là pour m'encourager.

J'adresse un immense merci à mes parents et beaux-parents. Je suis sûre que vous attendiez ça avec impatience, ça y est je vais enfin rendre ma carte étudiante. Vous m'avez soutenu de façon inconditionnelle alors que je ne vous ai pas rendu la tâche facile. Valérie, je te remercie de ta patience et ta curiosité à essayer de comprendre la science. Philippe, soucieux de mon bien-être, je n'ai manqué de rien pour l'aboutissement de ce parcours. Papa, Maman, merci d'avoir soutenu mes choix et de vous être engagés dans cette aventure avec moi. Vous m'avez toujours encouragée alors que moi-même je n'y croyais pas. Jamais à court de solutions, vous m'avez apporté des clefs à chaque étape. Simplement, Merci !

Ma sœur, nous avons bravé les tempêtes ensemble. Ton caractère de feu (une pensée pour le courageux Tom qui a pris le relai pour le canaliser) t'amène toujours à tes fins mais cela ne t'empêche pas de prendre soin des tiens. Merci pour toutes ses attentions. J'ai adoré nos moments parisiens, moments privilégiés me permettant de faire une pause et mieux réattaquer. Tu voles maintenant de tes propres ailes, mais tu sais que je ne serai jamais très loin. Je suis tellement fière de toi.

Je dédie ce manuscrit à ceux qui m'ont forgé mais qui n'ont pas pu voir l'achèvement de ce travail.
2010 ★ ; 2017 ★ ★ ★

Il y a des êtres qui se sont si profondément imprimés en nous qu'on porte à jamais leur empreinte.
Catherine Cusset

TABLE DES MATIERES

TABLES 5

ABBREVIATIONS 8

AVANT-PROPOS 13

INTRODUCTION 16

CHAPITRE 1 : Le FOIE 17

1. Histologies du parenchyme hépatique 18

1.1. Histologie descriptive 18

1.2. Histologie fonctionnelle 18

2. Composition cellulaire 19

2.1. Les hépatocytes 20

2.2. Les cholangiocytes 21

2.3. Les cellules endothéliales 21

2.4. Les cellules étoilées 22

2.5. Les cellules immunitaires 22

3. Le microenvironnement immunitaire 23

3.1. Les propriétés immunologiques du foie 23

3.1.1. Un organe lymphoïde original 23

3.1.2. La tolérance hépatique 23

3.2. Une composition enrichie en cellules de l'immunité innée 24

3.2.1. Les macrophages 24

3.2.2. Les cellules Natural Killer 25

3.2.3. Les cellules Natural Killer T 26

3.2.4. Les cellules dendritiques 27

3.3. Immunité adaptative 27

3.3.1. Les lymphocytes B 27

3.3.2. Les lymphocytes T 28

4. Les fonctions hépatiques 29

4.1. Fonction nutritionnelle 30

4.1.1. Le métabolisme lipidique 30

4.1.2. Le métabolisme glucidique 31

4.1.3. Le métabolisme protéique 32

4.2. Fonction de détoxification 32

4.3. Fonction de sécrétion 32

5. Le foie, un organe polyploïde 33

5.1. Polyploïdisation du foie 34

5.1.1. Polyploïdie et développement post-natal 34

5.1.2. Polyploïdie dans le foie adulte : stress, lésions hépatiques et vieillissement 36

5.2. Rôles de la polyploïdie hépatocytaire : quelques hypothèses 38

6. La régénération hépatique physiologique 39

7. Hépatotoxicité : mort cellulaire, réponse proliférative et modèles expérimentaux d'étude 42

7.1. Les voies de mort cellulaire 43

7.1.1. L'apoptose 43

7.1.2. La nécrose 44

7.1.3. La nécroptose 44

7.2. Modèles d'agressions aiguës du foie 46

7.2.1. Le modèle d'acétaminophène 47

7.2.2. Le modèle du tétrachlorure de carbone 49
7.2.2.1. Métabolisation du CCl_4 et conséquences cellulaires 51
7.2.2.2. Morts cellulaires induites par le CCl_4 52
7.2.2.3. Inflammation, prolifération hépatocytaire et remodelage hépatique 52
7.2.3. Autres modèles 54

CHAPITRE 2 : La MAPK p38 **56**
1. Caractéristiques de la MAP Kinase p38 **57**
1.1. Structure et isoformes 57
1.2. La voie de signalisation de la MAPK p38 59
1.2.1. Les activateurs en amont de p38 61
1.2.2. Phosphorylations de p38 62
1.2.3. Les inhibiteurs 63
1.2.4. Localisation cellulaire de p38 65
1.2.5. Les substrats 67
1.2.5.1. Activation et reconnaissance des substrats 68
1.2.5.2. Exemples de substrats de p38 et fonctions cellulaires associées 68
2. Fonctions hépatiques de p38 **72**
2.1. p38 et régulation du cycle cellulaire 73
2.2. p38 et stress oxydant 75
2.3. p38 et métabolisme 76
2.4. p38 et immunité 79
2.5. p38 et agressions aiguës du foie 81
2.6. p38 et tumorigenèse hépatique 83

OBJECTIFS & TRAVAUX 89
1. Préambule **90**
2. Modèle d'étude **92**
3. Rôle de la MAPK p38α dans un foie adulte sain : prolifération et polyploïdie hépatocytaires **93**
4. Rôle de la MAPK p38α dans les agressions aiguës du foie adulte **96**
Publication 100

DISCUSSION 138
1. p38α et contrôle du cycle cellulaire hépatocytaire dans un foie adulte sain **139**
2. p38α et hépatoprotection au cours d'une agression aigüe du foie **140**
3. p38α et réponse immunitaire **142**
4. p38 et thérapeutique **146**

BIBLIOGRAPHIE 149

ANNEXE 176

TABLES

• *TABLE DES FIGURES* •

Figure 1. Organisation anatomique du foie chez l'Homme. 18
Figure 2. Représentation schématique de la structure du foie. 19
Figure 3. Organisation des différents types cellulaires dans le foie. 20
Figure 4. Organisation des différentes cellules immunitaires dans le foie en conditions basales. 29
Figure 5. Représentation schématique de la zonation métabolique du lobule hépatique. 30
Figure 6. Les trois voies métaboliques majeures du foie. 31
Figure 7. Ploïdies nucléaire et cellulaire. 33
Figure 8. Polyploïdisation hépatocytaire pendant le développement post-natal. 35
Figure 9. Représentation schématique des principaux mécanismes impliqués dans la régénération après une hépatectomie partielle. 41
Figure 10. Voies de mort cellulaire principales dans le foie. 46
Figure 11. Métabolisation de l'acétaminophène (APAP). 48
Figure 12. Modèle simplifié de la toxicité de l'APAP. 49
Figure 13. Modèle simplifié de la toxicité induite par le tétrachlorure de carbone (CCl_4). 51
Figure 14. Métabolisation du CCl_4. 52
Figure 15. Représentation de la surface (à gauche) et en rubans (à droite) de la structure de p38α. 59
Figure 16. Représentation schématique de la voie de signalisation des MAPKs p38. 60
Figure 17. Représentation schématique des mécanismes de phosphorylation de p38. 63
Figure 18. Représentation schématique des mécanismes de phosphorylation de p38. 65
Figure 19. Modèles d'import/export nucléaire de p38. 67
Figure 20. Représentation schématique du rôle de p38 sur les points de contrôle G2/M et G1/S. 71
Figure 21. Exemples de fonctions hépatiques de p38. 73
Figure 22. Représentation schématique de la MAPK p38α dans la gluconéogenèse en conditions physiopathologiques. 77
Figure 23. Représentation schématique de la régulation du métabolisme du glucose et des lipides par la phosphatase MKP-1. 78
Figure 24. Représentation schématique des rôles de p38α dans les cellules immunitaires hépatiques. 81
Figure 25. Représentation schématique de la voie de signalisation induite par p38α impliquée dans le développement du CHC favorisé par le DEN. 85
Figure 26. La perte d'expression de p53 (modèle murin $p53^{\Delta H}$) exacerbe la prolifération des hépatocytes, favorise les altérations mitotiques et induit l'émergence d'un contingent cellulaire hautement polyploïde (≥8n) dans le tissu hépatique. 91
Figure 27. Modèle murin $p38\alpha^{\Delta H}$ et procédure expérimentale d'injection du CCl_4. 93
Figure 28. L'absence de p38α dans un foie adulte quiescent n'induit pas de modifications de la ploïdie et de la prolifération. 94
Figure 29. La délétion hépatocytaire de p38α ne modifie pas la progression en phase S des hépatocytes. 95
Figure 30. L'absence de p38α est hépatoprotectrice au cours d'une agression aiguë. 99
Figure 31. Les monocytes inflammatoires et les cellules NK sont modifiés dans le foie des souris $p38\alpha^{\Delta H}$. 145

• *LISTE DES TABLEAUX* •

Table 1. Propriétés des quatre isoformes de la famille des MAPKs p38. 58
Table 2. Tableau récapitulatif des différentes agressions aiguës du foie et leur effet sur p38 et les lésions hépatiques engendrées. 83
Table 3. Tableau récapitulatif des souris KO p38α et SIRT1 dans la carcinogenèse hépatique. 86

ABBREVIATIONS

• A •

α-Galcer	Alpha-Galactosylcéramide
AA	Acide Arachidonique
Akt	Protein Kinase B
Alb-Cre	Le gène de la Cre recombinase est placée sous le contrôle du promoteur de l'albumine
ALF	Insuffisance hépatique aiguë (Acute Liver Failure)
Alf-Cre	Le gène de la Cre recombinase est placée sous le contrôle du promoteur de l'alpha-foetoprotéine
ALI	Agression hépatique aiguë (Acute Liver Injury)
ALT	Alanine Aminotransférase
AMP-c	Adénosine Monophosphate Cyclique
AP	Acide Palmitate
Apaf-1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
APAP	Acétaminophène ou paracétamol
ASK1	Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
AST	Aspartate Aminotransférase
ATF2	Activating Transcription Factor 2
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine Triphosphate
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 related

• B •

Bak	Bcl-2 Homologous Antagonist Killer
Bax	Bcl-2–Associated X
Bid	BH3 Interacting-Domain Death Agonist
BMK1	Big MAP Kinase
BMP	Bone Morphogenic Protein
BrdU	Bromodéoxyuridine

• C •

C/EBP-β	CCAAT/Enhancer-Binding Protein Beta
Carm1	Arginine N-methyltransferase 4 protein
CCL	Chemokine (C-C motif) Ligand
CCl_4	Tétrachlorure de carbone
Cdc2	Cdk1 pour Cyclin-Dependent Kinase 1
Cdc42	Cell Division Control Protein 42 homolog
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
Chk1	Checkpoint Kinase 1
Chop	CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
ConA	Concanavaline-A
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
Cre	Cre recombinase
CREB	C-AMP Response Element-Binding protein
CYP2E1	Cytochrome P450 2E1

• D •

DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
db/db	Souris obèse, mutante pour le gène codant pour la leptine, avec dysfonctionnement des cellules β-pancréatiques
DEN	Diéthylnitrosamine
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DLK1	Dual-Leucine-zipper-bearing Kinase 1
Domain D	Site d'accostage
DUSP	Dual-Specificity Phosphatase

• E •

E21	$21^{ème}$ jour du développement embryonnaire
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eIF4E	Eukaryotic translation Initiation factor 4E
ERK	Extracellular signal-Related Kinase
ERT2	Estragen Receptor Tamoxifen 2
ESO	Epitopes dérivés du Stress Oxydatif ciblant les IgG

• F •

FAK	Focal Adhesion Kinase

FGF	Fibroblast Growth Factor
FLIP	FLICE-like Inhibitory Protein
FXR	Farnesoid X Receptor

• G •

G1/S	Transition de la phase G1 du cycle cellulaire vers la phase S
G2/M	Transition de la phase G2 du cycle cellulaire vers la mitose
G6Pase	Glucose-6-Phosphatase
Gadd45	Growth Arrest and DNA Damage 45
GalN	D-Galactosamine
GSH	Glutathion
GTPase	Guanine Tri Phosphatase

• H •

H2O2	Peroxyde d'hydrogène
H&E	Coloration Hemalun & Eosine
HBP1	HMG box-containing Protein 1
HBV	Virus de l'hépatite B
HCV	Virus de l'hépatite C
HepG2	Lignée cellulaire immortalisée de carcinome hépatocellulaire différencié
HePTP	Haemopoietic Tyrosine Phosphatase
HFD	High-Fat Diet
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HLA	Human Leukocyte Antigens
HP	Hépatectomie partielle
Hsp27	Heat Shock Protein 27
HURP	Hepatoma Upregulated Protein
HUVECs	Cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical

• I •

IFN	Interféron
IGF1	Insulin Growth Factor 1
IL	Interleukine
IL-1R	Récepteur de l'Interleukine 1
ILC	Innate Lymphoid Cell
IRF1	Interferon regulatory factor 1

• J •

JNK	c-Jun N-terminal Kinase

• K •

KO	Knock-Out

• L •

LEC	Long-Evans Cinnamon
LPS	Lipopolysaccharide
LSEC	Liver Sinusoidal Endothelial Cell
LT	Lymphocyte T

• M •

M1	Macrophage de type M1
M2	Macrophage de type M2
MAP2K	MAP Kinase Kinase (ou MAPKK)
MAP3K	MAP Kinase Kinase Kinase (ou MAPKKK)
MAP4	Microtubule-Associated Protein 4
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCD	Methionin-Cholin-Diet
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1 (ou CCL2)
MEKK1	Mitogen-activated protein Kinase Kinase Kinase 1
MIF	Macrophage Migration Inhibitor Factor
miR	micro-RNA
MK2	MAPK-Activated Protein Kinase 2
MKP	MAPK Phosphatase
MLKL	Mixed Lineage Kinase domain-Like
MMP-2	Matrix Metalloproteinase-2
Mnk	MAP Kinase-Interacting Serine / Threonine-Protein Kinase
MPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
MSK	Mitogen- and Stress-activated kinase
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin

• N •

NAC	N-Acétyl-Cystéine
NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
NAPQI	N-Acétyl-P-Benzoquinone Imine
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NK	Cellule Natural Killer
NKT	Cellule Natural Killer T
NLS	Nuclear Localization Sequence

NO	Monoxyde d'azote
Nrf2	Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2

• O •

ob/ob	Souris obèse, mutante pour le gène codant pour la leptine, sans dysfonctionnement des cellules β-pancréatiques
OCA	Acide Obéticholique
O-GlcNac	O-N-Acétylglucosaminylation
OGT	O-linked N-Acétylglucosaminyltransférase

• P •

P28	28ème jour post-natal
p53	Tumor Protein p53
Pb	Phénobarbital
PEPCK	Phosphoénolpyruvate Carboxykinase
PGAM5	Mitochondrial Phosphatase Phosphoglycerate Mutase 5
PP2	Protein Phosphatase 2
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPR	Pattern Recognition Receptor
PRAK	p38-Regulated/Activated Kinase
PTP-SL	Protein Tyrosine Phosphatase SL

• R •

Rac	Ras-related C3 botulinum toxin
RIPK	Receptor Interacting Protein Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species

• S •

SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SAPK	Stress-Activated Protein Kinase
SATB1	Special AT-Rich Sequence-Binding Protein-1
SEK1	aussi appelée MKK4
shRNA	Petit ARN en épingle à cheveux
SIRT1	Sirtuine 1
SOD	Superoxyde Dismutase
SQSTM1	Sequestosome 1
Srebp-1c	Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STEP	Striatal Enriched Tyrosine Phosphatase

• T •

TAB1	TGFβ-Activated Kinase 1 Binding Protein 1
TAK1	TGFβ-Activated Kinase 1
TAM	Tamoxifène
Tao	Thousand And One amino acid
TCR	Récepteur des lymphocytes T
TGF	Transforming Growth Factor
TGY	Thréonine-Glycine-Tyrosine
TL-R	Récepteur Toll-like
TNF-R	Récepteur du TNF
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha
TPL-2	Tumour Progression Locus 2
TRAF	TNF Receptor-Associated Factor
TRAIL	Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRX	Thioredoxine
TTR	Transthyrétine

• U •

UV	Rayonnement Ultraviolet

• V •

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

• W •

Wip1	Wild-type p53-Induced Phosphatase 1

• X •

Xbp1	X-box Binding Protein 1

• Y •

YAP	Yes-Associated Protein

• Z •

ZAP70	Zeta-chain-Associated Protein kinase 70

AVANT-PROPOS

Le foie, organe le plus volumineux du corps humain et dont les fonctions sont multiples et variées, est constamment soumis à des agressions aiguës, qu'elles soient induites par des virus, des toxines ou des médicaments. Afin de continuer à effectuer correctement ses fonctions, le tissu hépatique a donc besoin d'être réparé en modulant différents processus interconnectés, tels que la prolifération hépatocytaire, la mort cellulaire ou encore l'inflammation. Chez les mammifères, une protéine se trouve au carrefour de ces fonctions cellulaires : la MAPK p38α. De nombreux travaux décrivent un double rôle de cette protéine dans le foie. En effet, elle est considérée comme un suppresseur de tumeur en régulant négativement la prolifération des hépatocytes, mais peut aussi agir comme un oncogène en favorisant certains processus liés au cancer comme l'inflammation. Toutefois, le rôle de la MAPK p38α dans le foie adulte reste peu caractérisé, que ce soit à l'état quiescent ou lors d'une agression aiguë.

Dans ce cadre, au cours de mes quatre années de thèse, j'ai donc cherché à déterminer l'impact de la délétion hépatocyte-spécifique de p38α dans un foie adulte quiescent dans un premier temps, puis au cours d'une agression hépatique aiguë suite à l'injection d'une hépatotoxine, le tétrachlorure de carbone (CCl_4), constituant finalement l'axe majeur de mon projet de thèse.

Ce manuscrit de thèse se compose d'une introduction bibliographique, divisée en deux chapitres, l'un portant sur le foie et ses multiples caractéristiques, le second sur la MAPK p38 ainsi que ses fonctions hépatiques. Au cours de mes quatre années de thèse, le développement du projet m'a amené à utiliser un grand nombre de techniques et ainsi participer à l'optimisation de la culture primaire d'hépatocytes m'ayant permis d'être premier signataire d'une revue méthodologique sur ce sujet, "Incomplete cytokinesis/binucleation in mammals: The powerful system of hepatocytes" parue dans Methods Cell Biology, en annexe. Mes travaux de thèse sont ensuite présentés sous forme de manuscrit en anglais (Introduction – Matériels et Méthodes – Résultats – Discussion – Références – Légendes des figures et Figures). Enfin, la dernière partie est consacrée à la discussion de ces résultats et aux perspectives envisagées pour la suite de ce projet.

INTRODUCTION

Chapitre 1 :

Le FOIE

1. Histologies du parenchyme hépatique

1.1. Histologie descriptive

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain. Situé dans le cadran supérieur droit de l'abdomen, cet organe peut peser jusqu'à 1,5 kg (**Figure 1A**). Il est entouré par une capsule conjonctive appelée capsule de Glisson, qui en s'invaginant dans le parenchyme hépatique permet de délimiter des lobes anatomiques. On distingue deux lobes principaux (le droit et le gauche séparés par le ligament falciforme) et deux lobes accessoires (le carré et le caudé situés sur la face viscérale et séparés par le hile du foie, la vésicule biliaire est attachée à la limite de ces deux lobes) (**Figure 1B**) (*Abdel-Misih and Bloomston, 2010*).

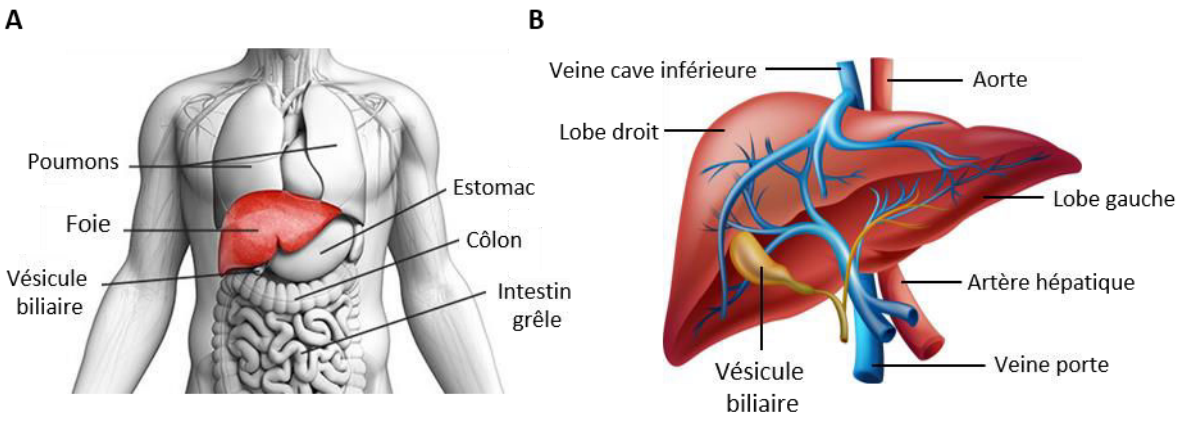


Figure 1. Organisation anatomique du foie chez l'Homme.

A. Localisation anatomique du foie dans l'organisme humain.

B. Schéma du foie humain, vue de face.

1.2. Histologie fonctionnelle

La division fonctionnelle hépatique est basée sur la classification de Couinaud, principalement utilisée en chirurgie. Le foie est divisé en secteurs, eux-mêmes divisés en segments. Les huit segments composant le foie sont définis en fonction de leur vascularisation permettant ainsi la résection d'un segment sans conséquences majeures sur les autres (*Couinaud et al., 1957*).

Le lobule hépatique constitue l'unité fonctionnelle du foie (**Figure 2A**). La position des différentes cellules et des réseaux fluidiques qui le composent lui confère une forme hexagonale. Deux réseaux fluidiques y coexistent : vasculaire et biliaire (**Figure 2B**). Concernant la voie vasculaire, le sang arrive au niveau de l'espace porte via les voies afférentes provenant du tube digestif. Les ramifications de l'artère hépatique transportent du sang oxygéné et celles de la veine porte du sang riche en nutriments. Après avoir circulé dans les sinusoïdes (situés entre les travées d'hépatocytes), le sang quitte le lobule au niveau de la veine centrolobulaire, se déversant ensuite dans les veines sus-

hépatiques puis dans la veine cave. Le foie contient environ 10% du volume sanguin total du corps humain. Les flux vasculaire et biliaire sont antiparallèles et se croisent au niveau de la triade portale. La bile produite par les hépatocytes est recueillie dans les canalicules biliaires, fusionnant par la suite pour former le canal hépatique commun. La bile est ainsi acheminée jusqu'à la vésicule biliaire où elle y est concentrée et stockée. La structure particulière et organisée des cellules par rapport aux vaisseaux permet une zonation anatomique et fonctionnelle du lobule hépatique (*Rappaport et al., 1954*).

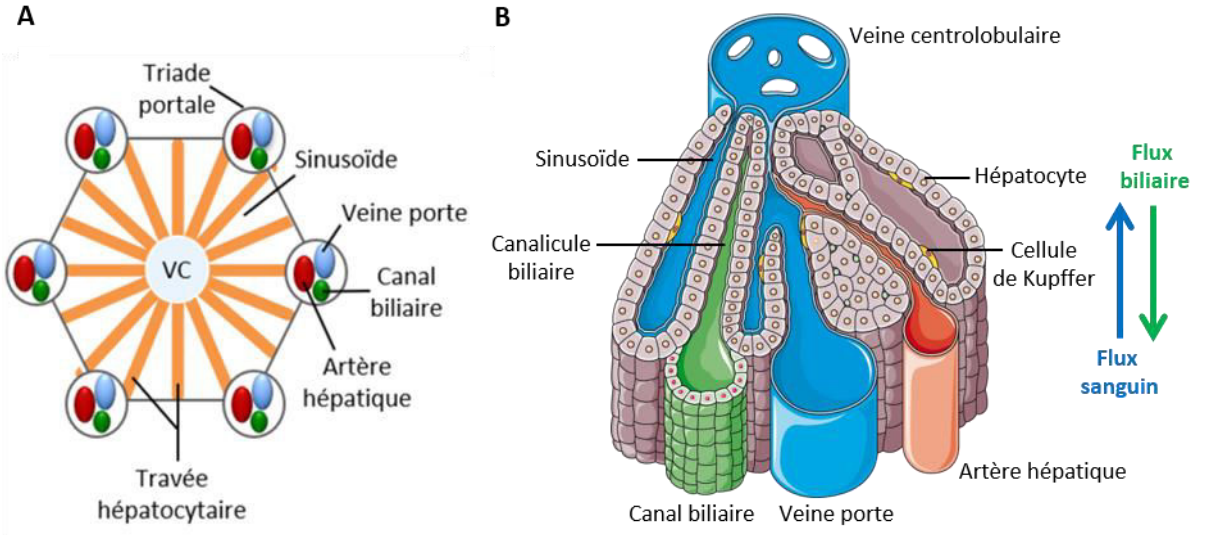


Figure 2. Représentation schématique de la structure du foie.

A. Lobule hépatique. L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique. Chacun est composé d'une veine centrale (VC), d'où partent les travées hépatocytaires jusqu'à la triade portale composée de la veine porte, l'artère hépatique et le canal biliaire. (Adaptée de *Gordillo et al., 2015*)

B. Structure 3D du lobule hépatique. Les travées hépatocytaires s'organisent le long de l'axe porto-central. Le sang circule dans les sinusoïdes jusqu'à la veine centrolobulaire. Le flux biliaire est antiparallèle et la bile est recueillie dans les canalicules biliaires.

2. Composition cellulaire

Dans le foie adulte, deux types cellulaires sont distingués. Les hépatocytes (60%, soit la population majoritaire) et les cholangiocytes (moins de 1%) forment les cellules parenchymateuses. Les cellules non-parenchymateuses sont, quant à elles, composées des cellules immunitaires (20%), des cellules endothéliales sinusoïdales (environ 20%) et des cellules étoilées (moins de 1%) (**Figure 3**). La vaste hétérogénéité de cellules permet ainsi au foie d'assurer ses fonctions, nombreuses et variées, comme nous le verrons par la suite (*cf § 4.*).

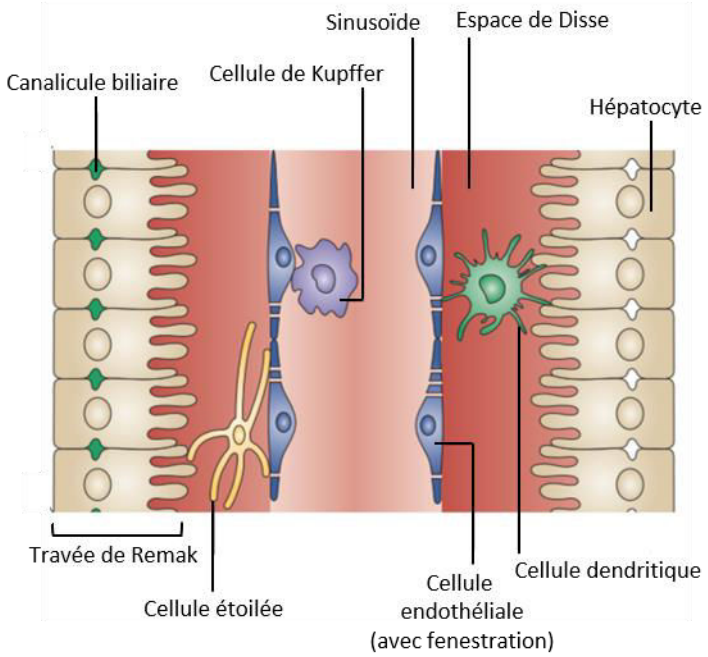


Figure 3. Organisation des différents types cellulaires dans le foie.
Le sinusoïde est bordé par les cellules endothéliales, dans lequel circulent les cellules immunitaires telles que les cellules de Kupffer. Les échanges entre le sang et les hépatocytes peuvent avoir lieu grâce à la présence de fenestrations au niveau des cellules endothéliales. L'espace situé entre les hépatocytes d'un côté, organisés en travée, et les cellules endothéliales de l'autre, délimite l'espace de Disse. Il peut accueillir les cellules étoilées ou les cellules dendritiques par exemple. (Adaptée de *Adams and Eksteen, 2006*)

2.1. Les hépatocytes

L'hépatocyte constitue la population cellulaire la plus abondante (60% du nombre des cellules hépatiques) et la plus volumineuse (80% de la masse hépatique) (*Blouin et al., 1977*). De forme polyédrique, les hépatocytes sont organisés en travée radiaire unicellulaire (travée de Remak), d'une épaisseur de 25 à 30 µm, allant de l'espace porte à la veine centro-lobulaire. Contrairement à la plupart des cellules épithéliales, les hépatocytes ont une polarité plus singulière. Tout d'abord, le pôle basolatéral, exposé au sang, est bordé par les cellules sinusoïdales dont il est séparé par l'espace de Disse. Cette lamina basale est constituée de microvillosités, favorisant les échanges avec le système vasculaire. La membrane plasmique des faces latérales, reliant les hépatocytes les uns aux autres, présente des replis laissant une lumière étroite qui forme le canalicule biliaire. La lumière de cette structure est située au pôle apical des hépatocytes où sont localisées des jonctions serrées. Du fait de la conformation du lobule hépatique, l'hépatocyte est caractérisé par plusieurs domaines apicaux. Les structures luminales sont continues et s'étendent sur toute la longueur d'une travée hépatocytaire formant un réseau dense de canalicules biliaires (*Müsch, 2014; Treyer and Müsch, 2013*). Cette polarité atypique implique une organisation particulière des organites au sein du cytoplasme de l'hépatocyte (*Weibel et al., 1969*). Grâce à la présence d'un nombre important de réticulum endoplasmiques, de mitochondries, de peroxysomes ou encore d'appareils de Golgi, la population hépatocytaire assure la

majorité des fonctions hépatiques, notamment métabolique et de détoxification. De plus, elle participe à l'établissement de la réponse immunitaire innée et adaptative locale. Il est intéressant de souligner que la demi-vie d'un hépatocyte est d'environ 200 jours chez le rongeur et de 400 jours chez l'Homme, expliquant le caractère quiescent du foie et le fait que l'indice mitotique soit extrêmement faible en conditions normales (*Macdonald, 1961*).

2.2. Les cholangiocytes

Les canaux biliaires sont composés d'un épithélium simple constitué d'une monocouche de cellules, les cholangiocytes. Leurs tailles (de 6 à 15 µm de diamètre) et leurs formes (aplatie ou cubique) varient en fonction de la largeur du canal biliaire qu'ils composent (*Tabibian et al., 2013*). De manière intéressante, les cholangiocytes et les hépatocytes ont la même origine embryonnaire. En effet, leur précurseur bipotent commun est l'hépatoblaste (*Germain et al., 1988; Shiojiri et al., 1991)*. Un hépatoblaste situé à proximité de la veine porte donne naissance à un précurseur cholangiocytaire, tandis qu'un hépatocyte est issu d'un hépatoblaste plus éloigné (*Gordillo et al., 2015*). Ce processus est notamment régulé par les facteurs Notch, Wnt, TGF-β (*Transforming Growth Factor* β), BMP (Bone Morphogenic Protein) et FGF (Fibroblast Growth Factor) (*Si-Tayeb et al., 2010*). Du point de vue fonctionnel, les cholangiocytes sont impliqués dans la modification de la composition de la bile, de par la sécrétion de facteurs de croissance et de peptides mais aussi en absorbant des ions, des acides biliaires, des acides aminés ou encore du glucose. De plus, une fonction immunitaire leur est également attribuée. En effet, les cholangiocytes sécrètent des cytokines permettant par exemple le recrutement de cellules immunitaires (*Syal et al., 2012*).

2.3. Les cellules endothéliales

L'unité fonctionnelle vasculaire du lobule hépatique est le sinusoïde. Ainsi les cellules le composant sont appelées cellules endothéliales sinusoïdales ou LSECs (pour Liver Sinusoidal Endothelial Cells). Ce réseau de capillaires permet une perfusion unidirectionnelle du sang, de la périphérie pour se jeter *in fine* dans la veine centro-lobulaire. La fonction principale des LSECs est de maintenir la pression artérielle hépatique constante, notamment pendant la digestion où le flux sanguin augmente. Pour ce faire, en conditions normales, les LSECs sont une source importante d'un composé vasodilatateur le monoxyde d'azote, NO. De plus, elles maintiennent les cellules étoilées du foie en quiescence, inhibant leur effet vasoconstricteur. Par ailleurs, les LSECs sont des cellules endothéliales peu communes puisqu'elles ne possèdent pas de lame basale et présentent de larges fenestrations (50 à 150 nm) dont le nombre et la taille varient en fonction de l'état nutritionnel. L'endothélium hépatique est ainsi l'endothélium le plus perméable de l'organisme. Alors que les LSECs retiennent les globules rouges et les plaquettes du côté sinusoïdal, elles laissent passer les protéines, les lipides, les médicaments ou

bien les virus (< 200 nm) par exemple dans l'espace de Disse, où sont localisées les cellules étoilées et les hépatocytes. Le nettoyage du sang fait également partie des attributions de la cellule endothéliale sinusoïdale grâce à sa forte activité lysosomale (*Poisson et al., 2017*). Il a ainsi été montré qu'un dysfonctionnement des LSECs et une perte de leurs propriétés sont impliqués dans l'initiation et la progression de maladies hépatiques chroniques telles que la cirrhose (*Miyao et al., 2015*), mais aussi dans le développement du carcinome hépatocellulaire (CHC) (*Semela and Dufour, 2004*). Enfin, les LSECs ont un rôle majeur dans la régulation de la réponse immunitaire. Elles interagissent avec les leucocytes via leur fonction de présentatrices d'antigènes. De plus, elles peuvent avoir des propriétés anti-inflammatoires dans un contexte d'inflammation (*Limmer et al., 2000*).

2.4. Les cellules étoilées

Anciennement appelées cellules de Ito, les cellules étoilées sont localisées dans l'espace de Disse. Bien qu'elles constituent la population de cellules les moins nombreuses dans le foie, elles ont entre autres un rôle essentiel dans le métabolisme de la vitamine A, stockée dans des gouttelettes lipidiques puis réabsorbée au niveau de l'intestin. Les cellules étoilées, synthétisant du collagène, sont également des actrices majeures dans la régénération et la fibrose hépatiques. En effet, lorsque le foie est lésé, les cellules étoilées reçoivent des signaux provenant des hépatocytes endommagés et des cellules immunitaires, les activant et entrainant leur transdifférenciation en myofibroblastes. L'activation prolongée des cellules étoilées induit la production de matrice extracellulaire entrainant la formation de tissu fibrotique, comme c'est le cas lors de la cirrhose (*Yin et al., 2013*). Par ailleurs, les cellules étoilées activées sécrètent notamment des cytokines pro et anti-inflammatoires mais aussi des chimiokines permettant le recrutement des lymphocytes, leur conférant une fonction importante dans la tolérance immunitaire (*Hsieh et al., 2015*).

2.5. Les cellules immunitaires

Le foie possède un système immunitaire unique (*Lapierre and Alvarez, 2007*). Premièrement, les cellules immunitaires sont relativement nombreuses puisqu'elles représentent 20% des cellules hépatiques totales. De plus, la composition en cellules lymphocytaires est particulière. En effet, contrairement au sang périphérique, les cellules Natural Killer (NK) et Natural Killer T (NKT) sont majoritaires par rapport aux lymphocytes T et B. Enfin, le système immunitaire est également composé de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) résidentes, dont les cellules de Kupffer, population la plus importante parmi les cellules immunitaires. Ces cellules de l'immunité innée et adaptative confèrent au foie des propriétés spécifiques notamment en tant qu'organe tolérogène, mais aussi en permettant une réponse immunitaire rapide et très efficace (*Bogdanos et al., 2013*). La partie suivante est

spécifiquement consacrée à ce système immunitaire hépatique afin de décrire plus en détails sa singularité.

3. Le microenvironnement immunitaire

3.1. Les propriétés immunologiques du foie

3.1.1. Un organe lymphoïde original

Certains organes ont des fonctions de production et de maturation des cellules immunitaires, comme le thymus et la moelle osseuse. Ce sont les organes lymphoïdes primaires. D'autres organes sont le site de l'activation des lymphocytes naïfs et ainsi de l'initiation de la réponse adaptative, ce sont les organes lymphoïdes secondaires, comme c'est le cas de la rate, des ganglions lymphatiques ou du foie. Fait intéressant, pendant l'embryogenèse (à partir de E7.0), le foie est le lieu principal de l'hématopoïèse fœtale. Les cellules immunitaires qui y sont produites, le quittent pour aller coloniser les autres organes, dont la moelle osseuse qui deviendra l'organe dominant de l'hématopoïèse chez l'adulte. En effet, l'hématopoïèse hépatique disparait dès la première semaine post-natale (*Johnson and Moore, 1975*). Par ailleurs, le foie étant constamment exposé aux antigènes néo-synthétisés issus de la flore intestinale, de l'alimentation ou des micro-organismes pathogènes, des cellules acquièrent des propriétés inhabituelles, notamment la capacité de présenter des antigènes (CPA). Ainsi, quasiment toutes les cellules hépatiques sont des CPA, qu'elles soient conventionnelles, comme les cellules dendritiques ou les macrophages, ou non, comme les hépatocytes, les cellules endothéliales ou encore les cellules étoilées (*Crispe, 2011*).

3.1.2. La tolérance hépatique

Comme évoqué précédemment, la vascularisation particulière du tissu hépatique implique un flux continu d'antigènes intestinaux. Alors qu'ils devraient être reconnus comme du non-soi, ces antigènes sont tolérés par le foie. Cependant, ce dernier est néanmoins capable d'exercer une réponse immune efficace contre les pathogènes au moment opportun. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer cette tolérance hépatique principalement médiée par les lymphocytes T (**Figure 4**) (*Crispe et al., 2006*). Par exemple, les cellules telles que les cellules dendritiques, les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales sinusoïdales ou les cellules étoilées, peuvent présenter des antigènes aux lymphocytes T induisant leur activation transitoire puis leur apoptose. D'autre part, les cellules dendritiques, Natural Killer et Natural Killer T sécrètent notamment une cytokine immunosuppressive, l'IL-10, inhibant les lymphocytes T et favorisant les lymphocytes T régulateurs. Cette compétence tolérogène permet à la greffe de foie d'être une des transplantations la mieux tolérée (*Adams et al.,*

2015). Afin de renforcer cette tolérance, un traitement immunosuppresseur est nécessaire pour éviter le rejet de greffe du foie chez l'homme, toutefois chez certains mammifères comme la souris, le rat ou le cochon cette immunosuppression n'est même pas requise. En revanche, une compatibilité entre les systèmes HLA (Antigènes Leucocytaires Humains) entre le donneur et le receveur n'est pas directement impliquée dans le rejet de greffe. Le foie a également un rôle important dans la tolérance orale (*Weiner, 1997*). La situation vasculaire hépatique permet aux antigènes ingérés d'être présentés et tolérés lors de leur passage dans les sinusoïdes, et par extension dans le reste du corps. Toutefois, cette tolérance hépatique fait du foie un lieu assez permissif aux infections induites par le virus de l'Hépatite B ou C (*Cabrera et al., 2004; Stoop et al., 2005*).

Le foie est donc un organe immunologique surprenant qui doit constamment osciller entre tolérance et mise en place d'une réponse immunitaire appropriée afin de maintenir son homéostasie, et ce grâce à une composition unique en cellules immunitaires.

3.2. Une composition enrichie en cellules de l'immunité innée

Une défense rapide et efficace contre les toxiques provenant de l'apport sanguin intestinal est nécessaire, mais sans induire une réponse immunitaire démesurée et néfaste. Pour cela, le foie possède un système immunitaire inné développé afin de se protéger au mieux contre les infections (*Gao et al., 2008*). Cette immunité innée est composée de phagocytes (les macrophages) et de lymphocytes (les cellules NK et NKT).

3.2.1. Les macrophages

Les macrophages résidents du foie, aussi appelés cellules de Kupffer du nom du premier scientifique à les avoir décrites en 1876, représentent une large partie des macrophages résidents de l'organisme, soit environ 80%. Par ailleurs, ils constituent 35% des cellules non-parenchymateuses hépatiques (*Jenne and Kubes, 2013*). La classification des cellules de Kupffer n'est pas simple, cependant deux classes extrêmes sont classiquement distinguées selon le panel de marqueurs exprimés. Les macrophages de type M1 sécrètent plutôt des cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα, l'IL-6 ou l'IL-12 par exemple. *A contrario*, les macrophages de type M2, dits « alternativement activés » ou immunorégulateurs, expriment faiblement les cytokines pro-inflammatoires, mais induisent notamment l'expression de l'IL-10 anti-inflammatoire et favorisent les mécanismes de réparation (*Dixon et al., 2013*). Ces macrophages sont de plus en plus catégorisés en divers sous-types dont quelques-uns pourraient favoriser l'inflammation dans certaines circonstances (*Mosser and Edwards, 2008; Tacke and Zimmermann, 2014*). L'isolation des cellules de Kupffer n'est pas aisée non plus puisque peu de marqueurs ont été identifiés. Ainsi, chez la souris, les cellules de Kupffer $F4/80^+$ $CD68^+$

auraient plus une activité de phagocytose et correspondraient aux macrophages résidents, alors que les F4/80^{+} CD11b^{+} auraient plutôt une capacité de production de cytokines et auraient été recrutés (*Ikarashi et al., 2013*).

Les cellules de Kupffer sont localisées dans les sinusoïdes en contact direct avec la circulation sanguine (**Figure 4**). Par conséquent, ils sont les premiers acteurs intervenant contre une infection systémique. Leur rôle majeur de phagocytose, mais aussi de nettoyage des cellules mortes dans le parenchyme hépatique et la circulation sanguine, permettent d'établir cette première ligne de défense. Du point de vue pathologique, différents rôles ont été attribués aux cellules de Kupffer dont le changement d'activité est un indicateur de la mise en place de la maladie. Par exemple, lors d'une surdose d'acétaminophène, l'activation des cellules de Kupffer induit la sécrétion de cytokines hépato-protectives comme l'IL-6 et l'IL-10 permettant également la régénération (*Ju et al., 2002*). En revanche, des macrophages avec une activité prolongée sont impliqués dans les processus d'inflammation chronique, comme dans le cas des hépatopathies non-alcooliques (NAFLD et NASH) (*Tateya et al., 2011)*. Les cellules de Kupffer adaptent donc leur phénotype en fonction des signaux reçus localement. Ils peuvent aussi bien entretenir l'inflammation et la fibrose ou bien la résoudre et avoir un effet protecteur.

3.2.2.Les cellules Natural Killer

Les cellules Natural Killer (NK) hépatiques, originellement décrites comme des cellules de Pit par Wisse en 1976 chez le rat, sont caractérisées par de nombreux granules leur conférant une importante activité cytotoxique indépendante de la présentation d'antigène, induisant alors la lyse des cellules infectées par un virus ou des cellules transformées. Les NK participent à l'immunité innée en établissant une réponse précoce et efficace contre les infections, mais ils peuvent également orienter les réponses des lymphocytes T et B de l'immunité adaptative (*Andrews et al., 2003; Zheng et al., 2018)*. Le foie est particulièrement enrichi en cellules NK puisqu'elles représentent 25 à 40% des lymphocytes intra-hépatiques chez l'homme et 5 à 10% chez la souris. Les NK humains sont définis par les marqueurs CD56^{+} CD3^{-} et peuvent être séparés en deux sous-groupes selon la densité membranaire de CD56 : les CD56^{dim} (faiblement exprimés) ont plutôt des propriétés cytotoxiques contre les cellules tumorales par exemple alors que les NK CD56^{bright} (fortement exprimés) sécrètent préférentiellement des cytokines (*Tian et al., 2013*). Elles sont en proportions égales dans le foie tandis que dans la circulation périphérique les CD56^{dim} CD3^{-} représentent 90% des NK. Concernant la souris, les NK sont principalement caractérisés par les marqueurs NK1.1 CD3^{-}. Un grand nombre de récepteurs activateurs ou inhibiteurs sont localisés à la surface des cellules NK permettant l'exécution de leurs fonctions, à savoir la lyse des cellules cibles et la sécrétion de cytokines. La cytotoxicité des NK est principalement médiée par la sécrétion de la cytokine TRAIL (Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing

Ligand) pour laquelle les cellules tumorales ont une grande affinité (**Figure 4**) (*Takeda et al., 2001*). Lors de la pathologie hépatique, le rôle anti-fibrotique des NK est maintenant relativement bien décrit (*Melhem et al., 2006; Radaeva et al., 2006*). En effet, que la fibrose soit induite par un régime particulier (3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine Diet) ou par injections répétées de tétrachlorure de carbone (CCl_4), les NK stimulent la mort par apoptose des cellules étoilées qui sécrètent notamment du collagène, inhibant ainsi la formation de fibrose. Cette corrélation a également été reportée chez les patients atteints par le virus de l'hépatite C (HCV) (*Glässner et al., 2012)*. De fait, la diminution de l'activité des NK est associée à une accélération de la progression de la fibrose.

3.2.3. Les cellules Natural Killer T

Les cellules Natural Killer T (NKT) sont bien distinctes des cellules NK. En plus d'exprimer le marqueur NK1.1 comme les NK, les NKT coexpriment le CD3 et le récepteur de cellule T (TCR) les assimilant également aux lymphocytes T de l'immunité adaptative. Contrairement au TCR des lymphocytes T reconnaissant préférentiellement les antigènes peptidiques, le TCR des NKT est singulier puisqu'il reconnait surtout les glycolipides et des lipides, via un petit motif spécifique présenté par le CD1d (analogue du Complexe Majeure d'Histocompatibilité, CMH, de type I). Les NKT représentent 10 à 15%, et 20 à 30%, des lymphocytes intra-hépatiques respectivement chez l'homme, et la souris. Deux principaux sous-groupes de NKT sont différenciés en fonction de la structure du TCR (*Bandyopadhyay et al., 2016*). Les NKT de type 1, appelés aussi NKT invariants (iNKT), expriment un TCRαβ semi-invariant (la chaine α est invariante et est associée à un nombre restreint de chaines β) et sont stimulés par l'α-galactosylcéramide (ou α-Galcer), un glycolipide extrait d'une éponge de mer. Parmi eux, on distingue trois sous-populations selon l'expression de facteurs de transcription : $Tbet^+$ pour les iNKT1, $GATA3^+$ pour les iNKT2 et $ROR\gamma T^+$ pour les iNKT17 (*Lee et al., 2013*). Une fois activés, les iNKT sécrètent notamment de l'interféron γ (IFN-γ) et de l'IL-4 et peuvent ainsi activer les lymphocytes T par exemple. Les NKT de type 2, quant à eux, expriment un TCR avec des chaines α et β variées mais n'utilisent pas la chaine α invariante. Ils reconnaissent préférentiellement des sulfatides, des dérivés lipidiques extraits de la myéline, et sont capables de supprimer la réponse pro-inflammatoire des iNKT préservant le foie des lésions. Selon le contexte pathologique, les NKT peuvent avoir des rôles antagonistes (*Park et al., 2009*). Dans le cas d'une agression aiguë induite par le tétrachlorure de carbone (CCl_4), les iNKT ont un rôle protecteur en inhibant les effets pro-inflammatoires (sécrétion de TNF-α, IL-6 et MCP-1) des cellules étoilées activées. Cependant, lorsque les iNKT sont fortement activés par l'α-Galcer, dans cette même condition, les dommages hépatiques sont plus importants et la fibrose s'installe. L'action synergique du CCl_4 et de l'α-Galcer entraine une augmentation de l'IFN-γ et en conséquence, l'apoptose des hépatocytes. Un traitement chronique par le CCl_4, quant à lui, entraine la déplétion des

iNKT hépatiques. Ces travaux suggèrent que les iNKT semblent avoir un rôle dans la phase précoce de la fibrose mais pas dans les stades tardifs. De manière intéressante, une nouvelle population pouvant être assimilée aux iNKT a récemment été identifiée dans le foie : les Musocal-Associated invariant T ou MAIT (*Kurioka et al., 2016*). Ils représentent 20 à 50% des lymphocytes intra-hépatiques chez l'homme alors qu'ils sont peu nombreux chez la souris. Brièvement, ces cellules sont caractérisées par un TCR semi-invariant, une importante capacité d'activation et constituent la principale population de lymphocytes T hépatiques produisant de l'IL-17, leur permettant ainsi d'assurer un rôle essentiel de défense contre les bactéries et les virus.

3.2.4. Les cellules dendritiques

Localisées en zone périportale autour des vaisseaux et sous la capsule de Glisson, ces cellules interstitielles non phagocytiques ont plutôt un rôle d'immunomodulateur. Parmi les cellules dendritiques, deux sous-populations peuvent être distinguées : les myéloïdes et les plasmocytoïdes (*Lian et al., 2003*). Les cellules dendritiques myéloïdes sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) peptidiques, capables de stimuler l'immunité adaptative. Les cellules dendritiques plasmocytoïdes sont quant à elles principalement impliquées dans la défense virale via la sécrétion d'interféron. Dans le foie, les cellules dendritiques sont spécifiquement impliquées dans le maintien de la tolérance hépatique.

3.3. Immunité adaptative

La protection durable et à long terme du tissu, avec mise en place d'une mémoire immunologique vis-à-vis des antigènes, est assurée par l'immunité adaptative (dite aussi acquise) qui est historiquement composée par l'immunité humorale (principalement assurée par les lymphocytes B) et l'immunité cellulaire (les lymphocytes T).

3.3.1. Les lymphocytes B

Conventionnellement, les lymphocytes B constituent l'immunité humorale et ont des fonctions de production d'anticorps, de présentation d'antigènes ou encore de sécrétion de cytokines. Leur rôle dans le foie en conditions basales est peu caractérisé du fait de leur faible nombre (5% des lymphocytes intra-hépatiques) et de la difficulté à les isoler. Une étude a néanmoins montré que les lymphocytes B hépatiques ont un rôle pro-inflammatoire, via la sécrétion d'IFNγ, d'IL-6 et de TNFα, lorsqu'ils sont stimulés par le lipopolysaccharide (LPS) (*Zhang et al., 2013*). De plus, chez la souris, suite à une injection *in vivo* de la bactérie E. Coli, les lymphocytes B du foie sécrètent de l'IL-12 leur suggérant une activité de phagocytose, permettant alors la clairance bactérienne (*Nakashima et al., 2012*). Tout récemment, l'implication des lymphocytes B a été mise en évidence dans l'hépatocarcinogenèse, suggérant de

nouvelles stratégies thérapeutiques. Faggioli et collaborateurs ont ainsi montré que l'ablation des lymphocytes B $CD20^+$, sans modifier les lymphocytes T $CD4^+/CD8^+$, dans un modèle murin tumoral associé à de l'inflammation ($Mdr2^{-/-}$), diminue les voies de signalisation TNF-α et NF-κB permettant une réduction de la fibrose et de l'inflammation (diminution de CCL2 et du TGF-β1) (*Faggioli et al., 2018*). En complément, l'analyse d'une cohorte de patients avec un CHC sur fond de HCV a révélé une augmentation de l'infiltration des lymphocytes B dans les CHC faiblement différenciés et qui répondent peu au traitement. Une autre étude a montré que l'activation des lymphocytes B pouvait être révélatrice d'évènements précoces de l'évolution de la NAFLD vers le CHC (*Bruzzì et al., 2018*). Les biopsies de foie issues de patients avec une NAFLD montrent une infiltration élevée de lymphocytes B, ce qui est également corrélé à des niveaux augmentés d'IFN-γ et d'épitopes dérivés du stress oxydatif ciblant les IgG (ESO). Les zones infiltrées présentent une sévère inflammation et une importante fibrose. L'identification des ESO pourrait ainsi être une nouvelle stratégie afin de déterminer la progression de la pathologie et l'évolution de l'immunité adaptative favorisant l'installation de la stéatohépatite et le développement de la fibrose.

3.3.2. Les lymphocytes T

Les principaux lymphocytes T (LT) impliqués dans l'immunité adaptative sont : les LT exprimant un TCRαβ (LT $CD4^+$ et LT $CD8^+$) et les LT exprimant un TCRγδ (*Bogdanos et al., 2013*). CD4 et CD8 font référence aux antigènes à la surface des lymphocytes, ils sont respectivement présentés par les CMH de classe II et classe I. Alors que 85% des LT ont un récepteur T (TCR) constitué des chaînes α et β, les LT γδ ont un TCR composé de chaines γ et δ. Ces LT γδ sont particulièrement intéressants puisqu'ils sont jusqu'à cinq fois plus nombreux dans le foie (15% des LT) que dans la périphérie (1 à 5%). Leur rôle dans l'homéostasie du foie n'est pas très bien décrit. En revanche, ils sont plutôt protecteurs dans un contexte d'agression aiguë du foie. Par exemple, dans le cas d'une hépatite fulminante induite par la concanavaline A (Con-A) chez la souris, les LT γδ sécrètent de l'IL-17A agissant ainsi sur les NKT (*Zhao et al., 2011*). Au sein des LT $CD4^+$, les LT auxiliaires (ou LTh pour LT helper) prolifèrent pour activer les cellules de l'immunité innée. Les LT régulateurs (Trég) $CD4^+$ ont, pour leur part, un rôle dans le maintien de l'homéostasie et la tolérance immunitaire en inhibant les réponses inflammatoires innée et adaptative. Les lymphocytes cytotoxiques (LTc), parmi les LT $CD8^+$, sont les cellules tueuses de l'immunité adaptative (**Figure 4**). Enfin, mais de façon non exhaustive, les LTrég $CD8^+$ inhibent l'activité des LTh et la réponse immunitaire induite par une infection (*Shuai et al., 2016*). Récemment, des travaux ont montré la déplétion spécifique des LT $CD4^+$ intrahépatiques, et non des LT $CD8^+$, dans les foies murins avec une hépatopathie stéatosique dite non-alcoolique (NAFL) (*Ma et al., 2016*). Les LT $CD4^+$ étant impliqués dans l'immunosurveillance lors des processus cancéreux, cette étude montre par la suite qu'un défaut de cette population favorise l'émergence de carcinome hépatocellulaire.

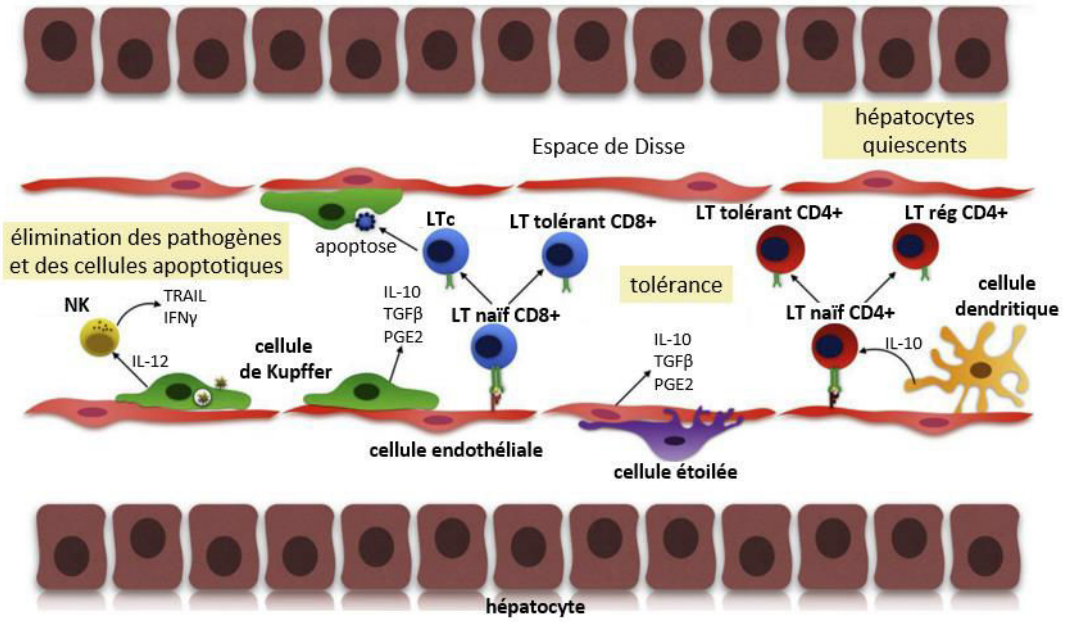


Figure 4. Organisation des différentes cellules immunitaires dans le foie en conditions basales.
En conditions basales, la plupart des hépatocytes sont quiescents. Les cellules non-parenchymateuses sont localisées dans le sinusoïde excepté les cellules étoilées qui sont dans l'espace de Disse. Les cellules de Kupffer ont un rôle dans la surveillance des pathogènes, des antigènes et des corps apoptotiques circulant dans le sang. L'interaction avec des pathogènes entraine la sécrétion de cytokines et active d'autres cellules comme les cellules NK, impliquées dans la destruction des pathogènes. Les cellules endothéliales interagissent avec les lymphocytes T (LT) permettant la tolérance hépatique, via la genèse de LT tolérants et de LT régulateurs (LT rég), ainsi que l'initiation de l'apoptose par le biais des LT cytotoxiques (LTc). (Adaptée de *Markose et al., 2018*)

4. Les fonctions hépatiques

Le foie assure de nombreuses fonctions vitales pour toutes les parties du corps. Elles peuvent être regroupées en trois classes principales : la synthèse, le stockage et la détoxification. L'arrangement spatial des lobules hépatiques selon l'axe porto-centrolobulaire implique une hétérogénéité des fonctions biochimiques et physiologiques. Il s'agit de la zonation métabolique (*Gebhardt and Matz-Soja, 2014*). Ainsi, il existe un gradient d'oxygène, de nutriments, d'hormones ou encore de cytokines par exemple, permettant une optimisation des fonctions hépatiques. Pour exemple, les mécanismes de néoglucogenèse et de β-oxydation se passent majoritairement en zone périportale, tandis que les processus de glycolyse, de lipogenèse et de détoxification sont observés en zone périveineuse (**Figure 5**) (*Birchmeier, 2016*). Un des régulateurs les plus importants de cette zonation est la signalisation Wnt/β-caténine. Cette dernière est activée dans les hépatocytes périveineux alors que côté périportal, elle est réprimée par la protéine Apc (*Benhamouche et al., 2006*). Cette dernière est considérée comme le gardien de la zonation hépatique (**Figure 5**).

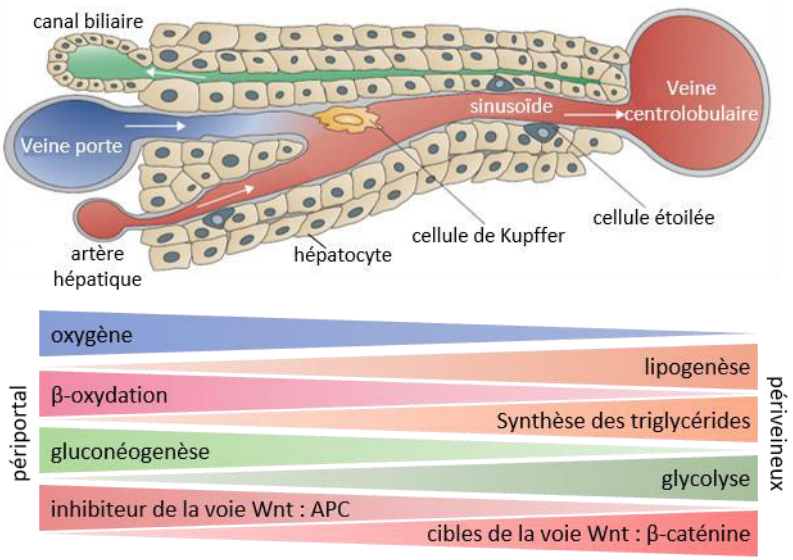


Figure 5. Représentation schématique de la zonation métabolique du lobule hépatique.
Le gradient d'oxygène permet une séparation des fonctions métaboliques du foie. Les hépatocytes périportaux sont spécialisés dans la β-oxydation et la gluconéogenèse, alors que les hépatocytes périveineux réalisent plutôt la lipogenèse, la synthèse des triglycérides et la glycolyse. Cette zonation est médiée par la voie de signalisation Wnt/β-caténine. (Adaptée de *Birchmeier, 2016*)

La suite de ce paragraphe est consacrée plus en détails aux fonctions nutritionnelle, d'excrétion et de détoxification.

4.1. Fonction nutritionnelle

Pour s'adapter aux différents états nutritionnels, le foie a la possibilité d'influencer le métabolisme des lipides, des glucides et des protéines (**Figure 6**) (*Rui, 2014*).

4.1.1. Le métabolisme lipidique

Les lipides provenant de l'alimentation circulent sous forme de « remnants » de chylomicrons jusqu'au foie. Puis, pour pouvoir être stockés dans le tissu adipeux ou exportés vers les tissus périphériques, il est nécessaire qu'ils soient transformés en triglycérides auxquels sont ajoutées des lipoprotéines synthétisées par le foie. Ils repartent ainsi sous forme de VLDL (Very Low Density Lipoprotein), de HDL (High Density Lipoprotein) ou de LDL (Low Density Lipoprotein). Le foie est également le lieu de la β-oxydation (lipolyse), réaction par laquelle les triglycérides sont transformés en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA), substrat énergétique du cycle de Krebs. A l'inverse, l'acétyl-CoA peut aussi être utilisé pour générer du cholestérol et des acides gras *de novo* via la lipogenèse. Les hépatocytes sont capables physiologiquement de stocker les triglycérides dans leur cytoplasme lorsque l'apport d'acides gras est en excès. Cependant si cette accumulation, associée à une β-oxydation insuffisante, est pathologique, on parle de stéatose hépatique (*Ipsen et al., 2018*).

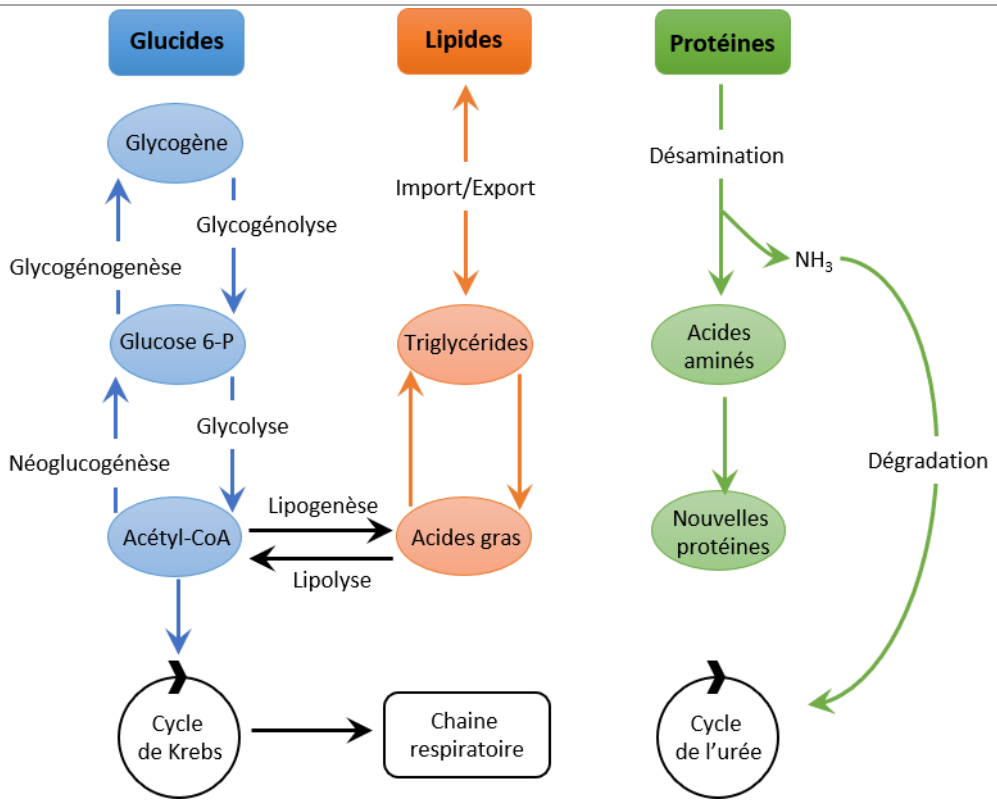


Figure 6. Les trois voies métaboliques majeures du foie.
Le métabolisme glucidique ; le métabolisme lipidique ; le métabolisme protéique.

4.1.2. Le métabolisme glucidique

Afin de maintenir la glycémie constante (quantité de glucose dans le sang), le foie est capable de faire la balance entre apport de glucides et besoins énergétiques de l'organisme. Si l'apport est supérieur aux besoins, alors un signal insulinique induit la transformation du glucose en glycogène pour être stocké grâce au processus de glycogénogenèse (*Cherrington et al., 1998*). *A contrario*, l'adrénaline et le glucagon activent la voie de la glycogénolyse permettant ainsi de métaboliser le glycogène et de produire du glucose en cas d'augmentation des besoins des tissus périphériques (*Hvidberg et al., 1994; Young et al., 1993*). Néanmoins, lorsque les réserves sont épuisées, d'autres substrats peuvent être utilisés, tels que les acides aminés, l'acide lactique, le fructose ou le galactose, pour être convertis en glucose via la réaction de néoglucogénèse. Certains travaux décrivent par ailleurs un rôle des cytokines dans la régulation de ces réactions biochimiques. Ainsi, l'activation de l'insuline au niveau du cerveau conduit à une augmentation du taux d'IL-6 hépatique qui, via la phosphorylation du facteur STAT3, inhibe alors la néoglucogenèse (*Inoue et al., 2006*). Enfin, il est intéressant de souligner que le glucose, transformé en pyruvate, participe également à la formation d'acétyl-CoA impliqué dans la lipogenèse des triglycérides et qu'une altération de cette voie est largement impliquée dans le développement de la stéatose hépatique (*Samuel and Shulman, 2018*).

Le glucose participe également à la formation d'acétyl-CoA impliqué dans la lipogenèse des triglycérides. Par ailleurs, il a aussi été décrit l'implication de certaines cytokines dans la régulation de ces réactions biochimiques. Par exemple, l'IL-6 inhibe la néoglucogénèse en activant STAT3 (*Inoue et al., 2006*).

4.1.3. Le métabolisme protéique

Lors de la digestion, la protéolyse libère des acides aminés. A la différence des lipides ou des glucides, les acides aminés ne peuvent pas être stockés dans le foie. Ils vont cependant y subir une modification irréversible consistant en une désamination avec formation d'un groupement amine (NH_2), pour pouvoir ensuite participer à la synthèse des protéines plasmatiques telles que les globulines ou l'albumine, ou bien constituer une source d'énergie en tant que substrat pour le cycle de Krebs ou substrat de la néoglucogénèse après métabolisation en acide pyruvique (*Schutz, 2011*).

4.2. Fonction de détoxification

En tant que filtre de l'organisme, le foie est en première ligne au contact des substances toxiques. Une fois transformées en produits non-toxiques, ces derniers peuvent être éliminés via la bile pour les produits liposolubles et par le sang pour les produits hydrosolubles. De cette manière, le groupement amine, formé lors de la désamination des protéines, lie un atome d'hydrogène pour former de l'ammoniac (NH_3), or ce dernier étant toxique, il est excrété dans les urines via la formation d'urée (**Figure 6**) (*Shambaugh, 1977*). L'ammoniac peut aussi être directement éliminé par le rein notamment en cas de jeûne, d'acidose et d'insuffisance hépatique. La bilirubine est, quant à elle, éliminée par les voies biliaires (*Menken et al., 1966*). En effet, les hépatocytes captent la bilirubine libre issue de la dégradation de l'hémoglobine, non hydrosoluble et toxique pour les cellules nerveuses, afin de la conjuguer à l'acide glycuronique. Elle devient alors un composant essentiel de la bile, à laquelle elle donne sa couleur jaunâtre. Concernant l'alcool, l'éthanol pur est délétère pour le foie ainsi que le premier produit de sa métabolisation, l'acétaldéhyde. Celui-ci est ensuite modifié en acétate puis en acétyl-CoA, utilisé notamment dans la synthèse des acides gras. C'est pourquoi, une consommation excessive d'alcool peut entrainer une stéatose (*Lieber et al., 1965*). Enfin, les médicaments pris par voie orale arrivent aussi directement au foie où une partie des substances actives est immédiatement dégradée, il s'agit de la clairance hépatique.

4.3. Fonction de sécrétion

Le même type cellulaire (les hépatocytes) possédant les fonctions mixtes exocrine et endocrine de l'organe, le foie est considéré comme une glande amphicrine homotypique. La principale fonction exocrine est la sécrétion en continu, par les hépatocytes, de 0,8 à 1 litre de bile par jour, dont la

composition est ensuite modifiée par les cholangiocytes (*Boyer, 2013*). Ce liquide jaune brunâtre est composé de 97% d'eau, d'acides biliaires, de sels biliaires, de phospholipides, de bilirubine et d'ions. Les propriétés des acides et sels biliaires permettent le transport des produits liposolubles à éliminer par l'organisme. La fonction endocrine hépatique quant à elle consiste à synthétiser des hormones, IGF1 pour Insulin Growth Factor 1 (*Sjögren et al., 1999*), et des protéines, comme l'érythropoïétine *(Göpfert et al., 1997*) et la thrombopoïétine (*Wolber and Jelkmann, 2002*) relarguées dans le sang retournant dans la circulation générale.

5. Le foie, un organe polyploïde

Alors que la plupart des cellules des mammifères sont diploïdes (2n, n désignant le nombre de lots de chromosomes spécifique à l'espèce), une caractéristique physiologique essentielle des hépatocytes est leur statut polyploïde, c'est-à-dire le fait de posséder plus de deux jeux de chromosomes homologues (*Alfert and Geschwind, 1958; Brodsky and Uryvaeva, 1977; Carriere, 1969*). Ainsi, à l'âge adulte, la proportion d'hépatocytes polyploïdes atteint 80 à 90% chez la souris C57Bl6j, 70 à 80% chez le rat Wistar et un peu plus de 20% chez l'humain.

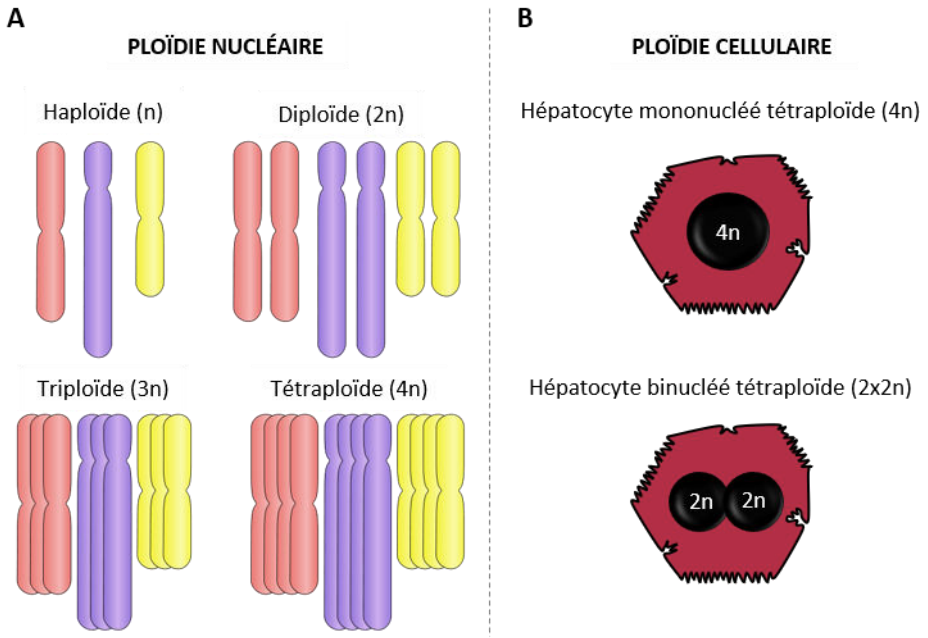


Figure 7. Ploïdies nucléaire et cellulaire.

A. Ploïdie nucléaire. Elle est définie en fonction du nombre de lots de chromosomes (n).

B. Ploïdie cellulaire. Elle est définie en fonction du nombre de noyaux dans la cellule (mononucléée, binucléée).

Chaque hépatocyte est caractérisé par deux niveaux de ploïdie : le nombre de noyaux qu'il contient (ploïdie cellulaire, **Figure 7A**) et par le nombre de jeux de chromosomes contenu dans chaque noyau

(ploïdie nucléaire, **Figure 7B**). Chez les rongeurs, les hépatocytes polyploïdes sont principalement tétraploïdes 4n (binucléés avec deux noyaux diploïdes ou mononucléés avec un noyau tétraploïde) et octoploïdes 8n (binucléés avec deux noyaux tétraploïdes ou mononucléés avec un noyau octoploïde) (*Duncan et al., 2010; Guidotti et al., 2003*). Chez l'homme, les hépatocytes sont principalement tétraploïdes (*Toyoda et al., 2005*).

5.1. Polyploïdisation du foie

5.1.1. Polyploïdie et développement post-natal

Au cours des trois premières semaines après la naissance, le foie est presque exclusivement constitué d'hépatocytes diploïdes (mononucléés 2n). Après le sevrage, la proportion d'hépatocytes diploïdes commence à baisser de manière significative et est corrélée avec l'apparition successive d'hépatocytes tétraploïdes binucléés (2x2n) puis tétraploïdes mononucléées (4n) (*Guidotti et al., 2003; Margall-Ducos et al., 2007*). Mon équipe a précédemment démontré qu'au cours du développement post-natal un programme de division cellulaire, caractérisé par un processus de cytodiérèse incomplète, induit la genèse des hépatocytes tétraploïdes à deux noyaux (2x2n), cellule pivot dans la polyploïdisation progressive du foie (**Figure 8**) (*Guidotti et al., 2003; Margall-Ducos et al., 2007*). L'augmentation dans le tissu hépatique de la concentration hormonale d'insuline au moment du sevrage contrôle spécifiquement la genèse des hépatocytes polyploïdes (*Celton-Morizur et al., 2009*). En effet, les travaux de notre groupe montrent que la diminution du taux d'insuline circulante au cours du développement post-natal (traitement de rats allaités par un agent diabétogène, la Streptozotocine STZ), abolit la genèse d'hépatocytes tétraploïdes au profit de celle des hépatocytes diploïdes. A l'inverse, lorsque le taux d'insuline circulante est augmenté (injections d'insuline), la genèse d'hépatocytes tétraploïdes est amplifiée. Par ailleurs, notre équipe a également établi que la signalisation insulinique contrôle ce processus en régulant la voie Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / Protein kinase B (AKT) – RhoA. En effet, en culture primaire d'hépatocytes de rat, l'altération de l'activation de la GTPase RhoA empêche la réorganisation du cytosquelette d'actino-myosine, nécessaire au déroulement des étapes tardives de la mitose, conduisant ainsi à la genèse de la descendance binucléée.

L'hépatocyte binucléé tétraploïde conserve la capacité à ré-entrer dans un cycle de division engendrant la formation de deux cellules filles mononuclées tétraploïdes (4n) à la suite d'un cycle cellulaire complet classique ou bien d'une seule cellule binucléée octoploïde (2x4n) après un second évènement de cytodiérèse incomplète (*Gentric and Desdouets, 2014*). Les travaux de mon équipe ont par ailleurs montré que l'ensemble de ces processus prend place dans un contexte de prolifération

cloisonnée, empêchant ainsi toute hyperploïdisation (≥8n) du tissu hépatique (*Celton-Morizur et al., 2009*).

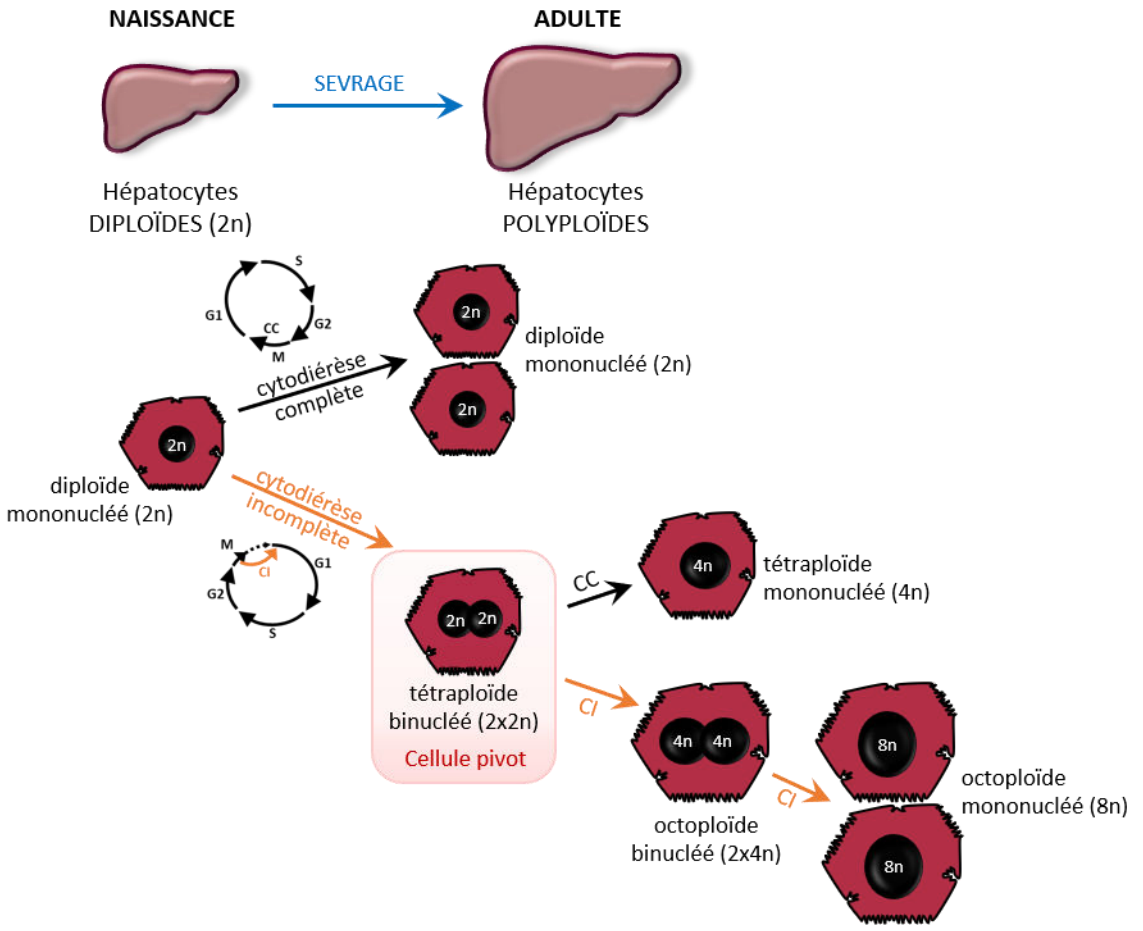


Figure 8. Polyploïdisation hépatocytaire pendant le développement post-natal.

Les hépatocytes à la naissance sont exclusivement mononucléés diploïdes (2n). A la transition allaitement-sevrage, les hépatocytes diploïdes peuvent alors s'engager dans un cycle de division normal (cytodiérèse complète, CC) engendrant une descendance mononucléée diploïde. Ils peuvent également réaliser un cycle cellulaire avec une cytodiérèse incomplète (CI) entrainant la formation d'un hépatocyte binucléé tétraploïde (2x2n). C'est par ce mécanisme que la polyploïdisation se met en place progressivement dans le parenchyme hépatique, avec la genèse d'hépatocytes tétraploïdes ou octoploïdes, avec un ou deux noyaux. (Adaptée de *Gentric et al., 2012*)

D'autres travaux ont permis de montrer qu'en plus de la signalisation insulinique, la voie des facteurs de transcription E2Fs et le facteur miR-122 sont entre autres impliqués dans la polyploïdisation du tissu hépatique au cours du développement post-natal. L'utilisation de modèles murins présentant une délétion hépatospécifique des facteurs E2F1 et E2F8 par l'équipe de De Bruin, a ainsi montré que ces protéines régulent de manière antagoniste des programmes transcriptionnels impliquant des gènes de la cytodiérèse : le facteur E2F1 agit comme un activateur, tandis que le facteur E2F8 agit comme un répresseur de la polyploïdisation hépatocytaire (*Pandit et al., 2012*). Plus récemment, l'équipe de

Duncan a mis en évidence un rôle clé des microARNs (miARNs) dans le contrôle du processus de binucléation des hépatocytes au cours du développement du foie (*Hsu et al., 2016*). Elle a ainsi montré que la perte d'expression hépato-spécifique du gène Dicer1 (membre de la famille des ribonucléases III intervenant dans la génération des miARNs), entraine une réduction drastique des hépatocytes binucléés, suggérant donc que les miARNs contrôlent le programme de cytodiérèse dans le foie. Ils ont par ailleurs identifié chez des animaux contrôles près de 85 miARNs exprimés de manière différentielle au cours des deuxième et troisième semaines du développement hépatique postnatal. Parmi ces derniers, le facteur miR-122 a retenu leur attention car en plus de représenter plus de 70% des miARNs totaux dans les hépatocytes, miR-122 était déjà connu pour réguler des gènes clés de la cytodiérèse tels que cux1 et rhoA (*Lagos-Quintana et al., 2002; Wang et al., 2014c; Xu et al., 2010*). La perte de miR-122 spécifiquement dans le foie murin conduit à une réduction drastique (60 à 70%) de la fraction binucléée à 4 semaines et ce tout au long de la vie. Fait intéressant, la réexpression de miR-122 dans ces souris suffit à restaurer le défaut de binucléation. Ces travaux ont par ailleurs montré que miR-122 agit comme un antagoniste des effecteurs mitotiques tels Cux1, RhoA, Mapre1, Iqgap1, Nedd4l et Slc25a34, favorisant ainsi la mise en place des événements de cytodiérèse incomplète et donc la genèse des hépatocytes binucléés.

Malgré ces découvertes récentes, de nouveaux travaux seront nécessaires pour mieux comprendre comment ces différents facteurs interagissent entre eux afin de contrôler le programme de cytodiérèse incomplète et réguler la polyploïdisation du tissu hépatique au cours du développement post-natal.

5.1.2. Polyploïdie dans le foie adulte : stress, lésions hépatiques et vieillissement

Le foie adulte est un organe quiescent, mais face à différents stimuli ou agressions (hépatectomie partielle, administration de facteurs de croissance spécifiques, altérations du foie induites par des drogues ou des toxines), il est capable de fournir une réponse proliférative importante et de moduler sa ploïdie.

Chez les rongeurs adultes, l'induction de la synthèse d'ADN par différents composés chimiques est associée à des changements variés de la ploïdie du foie et du contenu en ADN des noyaux. Par exemple, le nitrate de plomb induit la genèse d'hépatocytes binucléés (*Melchiorri et al., 1993*). Par ailleurs, l'adjonction de mitogènes hépatiques tels que le sodium phénobarbital, le 1,4-dichlorobenzène ou bien les prolifératrices de péroxysomes tels que le méthylclofénapate ou le WY-14 643 sont connus pour favoriser la genèse d'hépatocytes mononucléées (*Hasmall and Roberts, 1997; Martin et al., 2001; Miller et al., 1996)*.

La polyploïdie hépatocytaire peut aussi être modifiée par une surcharge métabolique (induction de lésions hépatiques). Différents travaux ont ainsi montré chez le rat LEC (Long-Evans Cinnamon /

modèle animal de la maladie humaine de Wilson), qui présente une accumulation excessive de cuivre et de fer au niveau hépatique, induite par une délétion du gène Atp7b (P-type copper ATPase), que le foie regroupe des hépatocytes avec des noyaux polyploïdes de grande taille. Par ailleurs, un délai dans la progression en mitose a été mis en évidence (*Muramatsu et al., 2000; Yamada et al., 1998*). De manière intéressante, l'injection de fer chez différents animaux (souris, rats, gerbilles) induit une polyploïdisation du foie proportionnelle à la dose utilisée. Ce processus, qui est caractérisé par une augmentation rapide de la fraction mononucléée 8n, ainsi que par une réduction prolongée de la population hépatocytaire binucléée 2x2n, peut être inhibé par la prise orale de chélateurs du fer (*Madra et al., 1995*).

Par ailleurs, plus récemment, les travaux de notre équipe sur différents modèles murins et plusieurs cohortes de patients, ont permis de montrer que, lors du développement d'une NAFLD, la ploïdie hépatocytaire est profondément altérée (*Gentric et al., 2015*). On observe ainsi une diminution de la population hépatocytaire diploïde mononucléée (2n) associée à une augmentation des populations mononucléés hautement polyploïdes (≥8n) ; ce contingent cellulaire étant rarement observé en contexte physiologique. Des approches ex-vivo (culture primaire d'hépatocytes), ont montré que les hépatocytes stéatosiques effectuent des cycles cellulaires particuliers d'endoréplication (enchainement de plusieurs cycles de réplication de l'ADN sans mitose), conduisant à une augmentation de la ploïdie nucléaire. Le stress oxydant, fortement exacerbé au cours de la NAFLD, active la voie « ATR-p53-p21 », induit alors un blocage de la transition G2/M qui favorise la mise en place des processus d'endoréplication. L'inhibition de ce stress à la fois *in vivo* et *in vitro* permet un sauvetage du phénotype (action d'anti-oxydants NAC/Trolox), en inhibant de la genèse du contingent cellulaire hautement polyploïde.

Il semble donc qu'il existe une corrélation notable entre la génération d'hépatocytes polyploïdes et une grande variété de stress cellulaires, comme cela a été démontré dans d'autres tissus (*Gupta, 2000*). Cependant, les mécanismes conduisant à la genèse d'hépatocytes polyploïdes et les conséquences sur la fonction du parenchyme hépatique restent, à ce jour, peu caractérisés.

Il est par ailleurs intéressant de souligner qu'un deuxième phénomène de polyploïdisation intervient au cours du vieillissement. En effet, des études chez l'homme et la souris ont montré l'augmentation du pourcentage d'hépatocytes polyploïdes en fin de vie (42% pour un être humain de 80 ans, 34% pour une souris de 18 mois) *(Kudryavtsev et al., 1993; Wang et al., 2014b*). La fonction de la polyploïdie liée à l'âge est assez controversée. Chronologiquement, certains travaux ont d'abord corrélé la polyploïdie induite par une hépatectomie partielle à la sénescence. Les hépatocytes polyploïdes générés à la suite de la chirurgie prolifèrent moins et présentent des marques de sénescence (telles que p21 et β-galactosidase) (*Sigal et al., 1999*). *A contrario*, plus récemment, une étude a montré l'accumulation de

marqueurs comme p16 ou p21, signes potentiels de sénescence, au sein du contingent hépatocytaire octoploïde de souris âgées, mais sans être assimilé à une réduction de la prolifération (*Wang et al., 2014b*). En effet, ce contingent octoploïde « vieux » possède les mêmes capacités de repeuplement d'un foie de souris *Fah* $^{-/-}$ (modèle murin dans lequel les hépatocytes sont détruits de façon continue par un défaut constitutif d'une enzyme du cycle de l'urée) que des hépatocytes octoploïdes « jeunes ».

5.2. Rôles de la polyploïdie hépatocytaire : quelques hypothèses

Comme nous avons pu le voir précédemment, le foie remanie sa ploïdie dès lors qu'il entre dans des processus développementaux ou est agressé. Le véritable rôle des hépatocytes polyploïdes demeure encore énigmatique mais quelques hypothèses ont néanmoins été avancées.

(1) De par sa fonction de détoxification, le foie est directement impliqué dans l'élimination des xénobiotiques nocifs pour le génome, pouvant alors induire des dommages à l'ADN et favoriser l'émergence d'une instabilité génomique. Du fait du nombre de copies de gènes augmenté par rapport à une cellule diploïde, l'hépatocyte polyploïde pourrait être protégé et atténuer les effets des mutations. Par exemple, une consommation excessive d'alcool peut entrainer des mutations ponctuelles de l'ADN qui pourraient alors participer au développement de cancers (*Seitz and Stickel, 2007*). Ainsi, la perte d'une variante du gène suppresseur de tumeur tel que p53 ou Rb serait moins délétère pour l'hépatocyte polyploïde possédant deux ou quatre fois plus de matériel génétique qu'un hépatocyte diploïde. De plus, une corrélation inverse entre ploïdie et prolifération a été reportée dans les cellules de carcinomes, à l'origine de l'amplification de la malignité (*Seglen, 1997; Tormos et al., 2015*).

(2) La polyploïdisation permettrait une économie d'énergie à la cellule en échappant à la mitose. En effet, la croissance tissulaire est très coûteuse en ressources énergétiques surtout lors du sevrage ou bien de la régénération qui sont des évènements clés pour le foie et pendant lesquels celle-ci doit être efficace et rapide. Ainsi la mise en place de cycles de cytodiérèse incomplète à la transition allaitement/sevrage permettrait de préserver le tissu hépatique qui subit de fortes modifications du métabolisme lipidique et glucidique (*Celton-Morizur et al., 2009*). L'augmentation de la polyploïdie à la suite d'une hépatectomie partielle est également associée à un remodelage métabolique, à savoir une diminution des gènes de la lipogenèse et de la glycolyse (*Miettinen et al., 2014*).

(3) La polyploïdie pourrait aussi permettre un « gain de fonction » augmentant les capacités fonctionnelles des hépatocytes et confèrerait au foie son large panel de rôles. Cette hypothèse a été contredite par les travaux de Lu qui n'ont pas montré de réelles différences dans l'expression génique

entre les classes de ploïdie hépatocytaire isolées par cytométrie (*Lu et al., 2007*). Néanmoins, la même année, un lien entre polyploïdie et expression génique associée à la survie cellulaire, la réparation de l'ADN, l'hypoxie ou le stress oxydatif a été mis en évidence lors de la comparaison des génomes de tissus hépatiques diploïde et polyploïdie (*Anatskaya and Vinogradov, 2007*). La question reste donc complètement ouverte pour cette hypothèse bien que des études sur d'autres types cellulaires feraient pencher la balance en faveur d'une fonction « gain de fonction » également pour l'hépatocyte polyploïde. Par exemple, la polyploïdisation des mégacaryocytes de la moelle osseuse (128n) est associée à la production de plaquettes (*Raslova et al., 2007*).

6. La régénération hépatique physiologique

Bien que le foie soit un organe quiescent à l'âge adulte, il a l'extraordinaire capacité de régénérer sous l'action de divers stimuli pour restaurer sa taille et son architecture ainsi que maintenir l'ensemble de ses fonctions. Cette réponse est intrinsèquement régulée dans son initiation et sa terminaison, et se trouve décrite sous le terme d'« hépatostat ». Différents modèles *in vivo* ont été développés pour étudier les mécanismes intervenant lors de ce processus. Les plus courants sont la régénération hépatique induite par l'hépatectomie partielle (régénération « physiologique ») ou celle induite par des produits chimiques (régénération « pathologique ») (*Mao et al., 2014*).

L'hépatectomie partielle aux deux-tiers (soit en pratique l'ablation d'environ 70% du foie) est la chirurgie la plus communément réalisée pour étudier la régénération physiologique et sa mécanistique est maintenant bien comprise (*Fausto et al., 2006; Gilgenkrantz and Collin de l'Hortet, 2018; Michalopoulos, 2017*). La restauration de la taille et de la masse hépatiques initiales (± 10%) est complète après 7 à 10 jours (*Stöcker and Heine, 1971*). Cette technique présente différents avantages. En effet, en réponse à la résection, les hépatocytes restants prolifèrent de manière synchronisée pendant les premières 48 heures, puis les autres types cellulaires interviennent successivement les uns après les autres (les cholangiocytes, les cellules de Kupffer, les cellules étoilées et enfin les cellules endothéliales sinusoïdales). Seules les cellules différenciées participent à ce mécanisme, les cellules progénitrices ne sont pas impliquées. De plus, il s'agit d'un modèle avec une faible réponse inflammatoire.

La régénération hépatique physiologique est caractérisée par trois phases en fonction des points de contrôle du cycle cellulaire : les phases de « priming » des hépatocytes, de prolifération et de terminaison (**Figure 9**).

(1) La phase de « priming » permet la sortie de quiescence et l'initiation de la prolifération des hépatocytes. L'activation des cellules de Kupffer par le TNFα permet la sécrétion d'IL6 se fixant alors

sur son récepteur situé sur les hépatocytes (*Taub, 2004*). En réponse, la voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) est activée ayant pour finalité la phosphorylation de STAT3 puis l'induction de l'expression des « immediate early genes » fondamentaux dans la transition G0/G1 du cycle cellulaire des hépatocytes (**Figure 9**) (*Cressman et al., 1995, 1996*). Cette signalisation est suivie de près par la translocation nucléaire de la β-caténine où elle régule de nombreux gènes essentiels à la progression vers la deuxième phase de prolifération, comme par exemple celui de la cycline D1 (*Monga et al., 2001*).

(2) La phase de prolifération hépatocytaire consiste à effectuer la transition G1/S à l'aide d'une deuxième vague de facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor) sécrété par le duodénum ou les glandes salivaires, l'amphiréguline et le TGFα (Transforming Growth Factor) se fixant sur l'EGFR, ou l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) sécrété par les cellules étoilées se liant au récepteur c-Met (**Figure 9**) (*Pediaditakis et al., 2001; Skov Olsen et al., 1988; Tan et al., 2005*). Il est intéressant de souligner que seule l'action conjointe de l'EGFR et c-Met est essentielle à la régénération hépatique. La perte d'expression simultanée de ces facteurs abolit le processus de régénération et conduit à une décompensation hépatique qui se traduit par une production d'ascites et une hyperammoniémie (*Paranjpe et al., 2016*). L'activation des récepteurs permet l'induction des voies de signalisation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), STAT3, Akt, ERK1/2, aboutissant ainsi à la transition de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire. En parallèle, une stéatose transitoire s'installe afin de constituer une réserve énergétique et une source de phospholipides indispensables à la formation des membranes plasmiques. Un défaut de cette stéatose physiologique entraine des troubles dans le processus de régénération (*Delahunty and Rubinstein, 1970; Shteyer et al., 2004*). La suite et fin du cycle cellulaire (phases S, G2 et mitose) s'effectue indépendamment de facteurs de croissances et la masse hépatique est restaurée après 1 à 2 cycles de division.

(3) Une fois cette restauration atteinte, les hépatocytes doivent arrêter de proliférer et retrouver un état quiescent. Cette phase est régie par différentes voies de signalisations antiprolifératives, parmi lesquelles celle du TGFβ (sécrété majoritairement par les cellules étoilées), la signalisation des intégrines et l'interaction du facteur C/EBP avec HDAC1 (protéine impliquée dans le remodelage chromatinien (Jin Hong Lewis, Hepatology, 2015) (*Apte et al., 2009; Jakowlew et al., 1991; Jin et al., 2015*). Ces facteurs permettent alors l'activation des SMADs (Mothers Against Decapentaplegic Homolog) induisant finalement la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et le retour à la quiescence (**Figure 9**) (*Macias-Silva et al., 2002*).

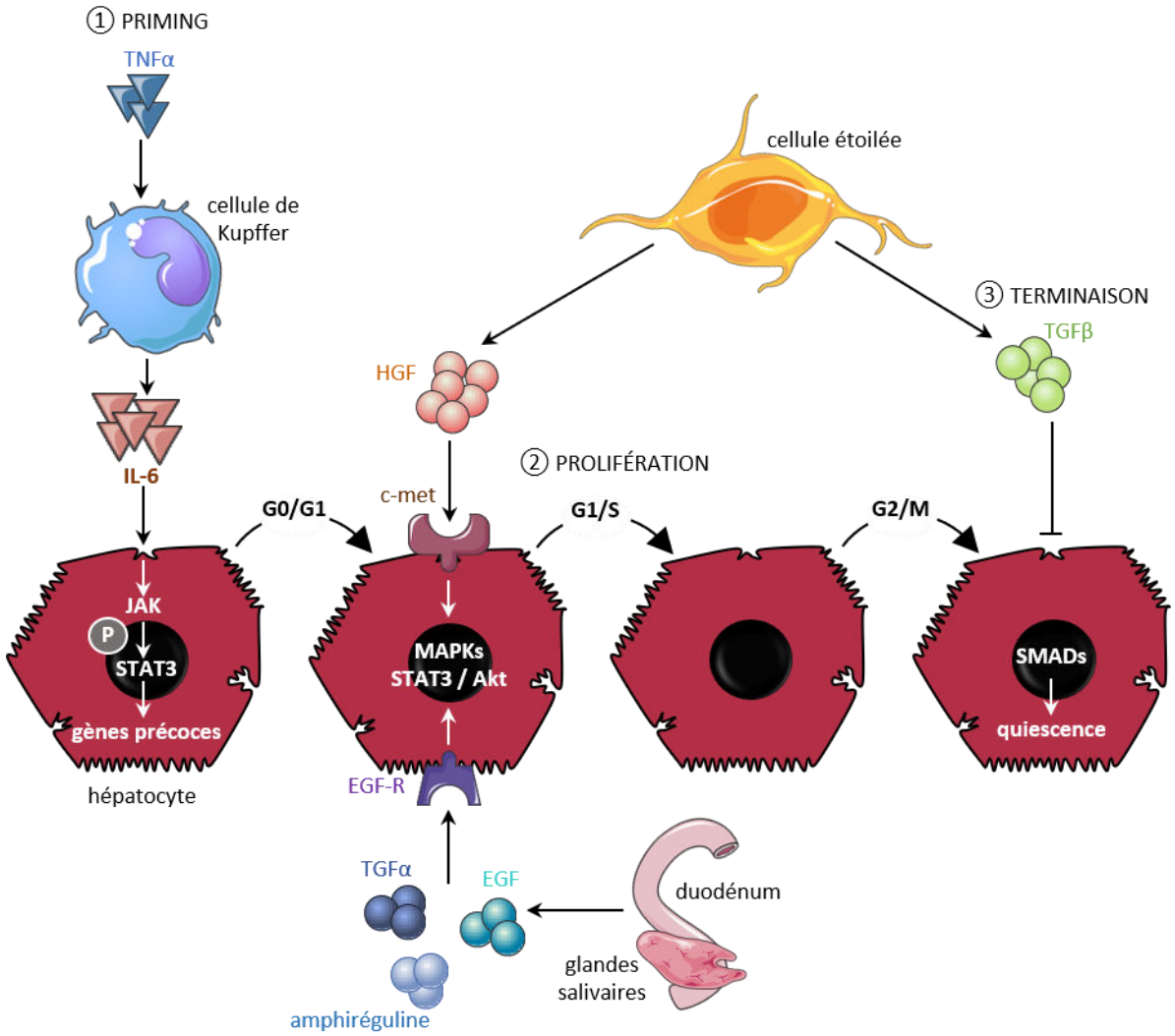


Figure 9. Représentation schématique des principaux mécanismes impliqués dans la régénération après une hépatectomie partielle.

1. Phase de priming. Après une HP, les cellules de Kupffer sont activées par le TNF-α et sécrètent de l'IL-6. En réponse, la voie JAK/STAT est activée et les gènes précoces sont transcrits permettant ainsi la sortie de quiescence des hépatocytes qui entrent alors en phase G1 du cycle cellulaire.
2. Phase de prolifération hépatocytaire. Les signalisations induites par l'HGF, l'EGF, le TGF-α et l'amphiréguline activent les voies des MAPKs, STAT3 et Akt permettant la transition G1/S.
3. Phase de terminaison. La sécrétion du TGF-β par les cellules étoilées permet l'arrêt du cycle cellulaire. Le retour à la quiescence est induit par les SMADs.
(Adaptée de *Taub, 2004*)

La régénération hépatique physiologique est largement accompagnée d'une modification de la ploïdie du tissu hépatique. En effet, en plus d'une disparition de la fraction hépatocytaire binucléée tétraploïdes 2x2n, les hépatocytes mononucléés diploïdes ou tétraploïdes sont directement convertis en hépatocytes mononucléées tétraploïdes et octoploïdes respectivement (*Gerlyng et al., 1993; Sigal et al., 1999; Wheatley, 1972*). Une étude notamment basée sur une approche de vidéomicroscopie en temps réel permettant de suivre le lignage des populations en fonction de leur ploïdie, a permis de

mettre en évidence les mécanismes régulant les changements de ploïdie au cours du processus régénératif (*Miyaoka et al., 2012*). Dans un premier temps, les hépatocytes augmentent de taille (hypertrophie), puis s'engagent dans le cycle cellulaire (hyperplasie). Cependant, seule la moitié des hépatocytes progressent jusqu'à la mitose en effectuant une cytodiérèse complète pour augmenter le pool d'hépatocytes. De manière intrigante, dès le deuxième jour du processus de régénération, des hépatocytes 16n sont retrouvés dans le tissu hépatique, mais de façon transitoire, puisqu'à la fin du processus, ces derniers ne sont jamais retrouvés. Sigal et collaborateurs ont suggéré que la disparition de ces hépatocytes hautement polyploïdes serait associée à la mise en place de mécanismes apoptotiques ciblant préférentiellement les hépatocytes hautement polyploïdes (*Sigal et al., 1999*). L'analyse de l'évolution à long terme d'animaux hépatectomisés révèle que les fractions hépatocytaires binucléées sont à nouveau visibles au moment de l'homéostasie hépatique, ce qui semble indiquer que les signaux mis en place après le sevrage seraient réactivés en fin de régénération (*Nadal and Zajdela, 1967*).

Enfin, il est intéressant de souligner que le volume hépatique retiré conditionne la réponse régénérative (*Gilgenkrantz and Collin de l'Hortet, 2018; Itoh and Miyajima, 2014*). Comme nous venons de le décrire, une hépatectomie aux deux-tiers est suivie d'une hypertrophie puis d'une hyperplasie des hépatocytes. Différemment, l'hépatectomie au tiers sera suivie par une simple augmentation du volume des hépatocytes sans entrée en cycle cellulaire (et donc sans modification de la ploïdie hépatocytaire) et sera suffisante pour compenser la perte de masse hépatique. Enfin, dans le cas d'une hépatectomie plus prononcée (résection à 80%-90% du foie), la capacité proliférative des hépatocytes étant dépassée, une reprogrammation des cholangiocytes en hépatocytes permettra la régénération compensatrice.

7. Hépatotoxicité : mort cellulaire, réponse proliférative et modèles expérimentaux d'étude

Dans un foie sain, la mort cellulaire permet le contrôle de l'homéostasie cellulaire et tissulaire en gardant un équilibre entre l'élimination des cellules « âgées » et le renouvellement cellulaire. Cependant, du fait de sa position dans l'organisme, le foie est très vulnérable aux agressions pouvant causer une mort cellulaire massive et, les vastes fonctions métaboliques ainsi que détoxifiantes prédisposent les hépatocytes aux lésions induites par les xénobiotiques et les toxines. Afin d'éviter une altération des fonctions hépatiques, la régénération doit donc être rapide et efficace, bien que le renouvellement des hépatocytes soit physiologiquement faible. La mort cellulaire est donc un paramètre relativement indicatif de la détection d'une maladie hépatique aiguë ou chronique, virale, métabolique ou encore d'origine auto-immune, grâce à la mesure des niveaux sériques des transaminases, comme l'alanine aminotransférase (ALT) et l'aspartate aminotransférase (AST) (*Kew, 2000*). La contribution et le mode de mort cellulaire sont dépendants de l'étiologie, de la durée et de

l'intensité des lésions hépatiques endurées. Les altérations morphologiques cellulaires et les voies biochimiques impliquées permettent de distinguer différents mécanismes : classiquement dans le foie, l'apoptose ou la nécrose, et récemment la nécroptose (*Luedde et al., 2014*).

7.1. Les voies de mort cellulaire

Plusieurs caractéristiques permettent de distinguer les différentes voies de mort cellulaire. La quantité d'ATP (Adénosine Triphosphate) est déterminante pour activer une voie de mort cellulaire plus qu'une autre, puisque l'apoptose est un programme dépendant de l'ATP contrairement à la nécrose lors de laquelle une interruption de la formation d'ATP intervient (*Ferrari et al., 1998*). De plus, l'inflammation est préférentiellement représentative de la nécrose au cours de laquelle une réponse inflammatoire importante apparait à la suite de la libération du contenu cellulaire. *A contrario*, les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés empêchant la sécrétion de composants intracellulaires nocifs.
Les différents modes de mort cellulaire seront présentés succinctement dans la suite de cette partie.

7.1.1. L'apoptose

L'apoptose est un processus hautement contrôlé. La digestion protéolytique entraine la désorganisation des structures intracellulaires, comme la désintégration du cytosquelette, des perturbations métaboliques ou encore la fragmentation de l'ADN. Puis, les corps apoptotiques sont notamment reconnus et éliminés par phagocytose réalisée par les macrophages. L'apoptose extrinsèque, initiée par les récepteurs de mort, est différenciée de l'apoptose intrinsèque, causée par un stress intracellulaire (*Galluzzi et al., 2018*).

(1) La voie extrinsèque (Figure 10A). Brièvement, la liaison des ligands, exprimés par les cellules immunitaires, aux récepteurs de mort cellulaire, tels que Fas (CD95), TNF-R1, TRAIL-R1/2, entraine le recrutement de protéines adaptatrices et des caspases initiatrices, les procaspases 8 et 10 (*Faubion and Gores, 1999*). La formation de ce complexe multiprotéique DISC (pour Death Inducing Signaling Complex) permet l'activation des caspases 8 et 10, induisant ainsi la cascade protéolytique avec activation des caspases effectrices, les caspases 3, 6 et 7, qui *in fine* clivent les substrats cellulaires.

(2) La voie intrinsèque peut être déclenchée par de nombreux stress intracellulaires tels que les dommages à l'ADN, le stress oxydant, les UVs, les toxines, le stress du réticulum endoplasmique, et ont tous pour conséquence un dysfonctionnement mitochondrial. Cette signalisation est médiée par la translocation des protéines pro-apoptotiques Bax (Bcl-2–associated X) et Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) du cytosol vers la mitochondrie où elles forment des pores dans la membrane externe, dépolarisent la membrane interne et permettent la sécrétion du cytochrome c **(Figure 10A)** (*Kalkavan and Green, 2018*). Ce dernier participe ensuite à la cascade apoptotique via la constitution

d'un complexe avec Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1) et la caspase 9, l'apoptosome, clivant les caspases 3, 6 et 7 (*Martinou and Youle, 2011*).

Les interconnections entre les deux voies sont également possibles. Par exemple, lors de l'apoptose extrinsèque, la caspase 8 active par clivage la protéine Bid (BH3 interacting-domain death agonist) qui facilite la sécrétion du cytochrome c et amplifie ainsi le signal apoptotique induit par les récepteurs de mort (*Schwerk and Schulze-Osthoff, 2005*).

7.1.2. La nécrose

La nécrose est caractérisée par l'apparition simultanée d'évènements cellulaires induits par le gonflement de la cellule à la suite d'une perte de la perméabilité membranaire plasmique. Les composés cellulaires sont alors relargués dans le milieu extracellulaire sous forme de bulles, caractéristiques morphologiques typiques de ce mode de mort cellulaire (*Guicciardi et al., 2013*). Il s'ensuit alors une réponse inflammatoire importante, particularité majeure de la nécrose, contrairement à l'apoptose où elle est réduite. La perte de l'homéostasie ionique entraine un gonflement cellulaire, une augmentation du calcium libre intracellulaire, l'activation de protéases et phospholipases, engendrant un défaut de la perméabilité membranaire mitochondriale. Le dysfonctionnement de la mitochondrie est dû à une déficience de la protéine MPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore) située sur la membrane interne et impliquée dans la perméabilité transitoire mitochondriale (*Bantel and Schulze-Osthoff, 2012*). Le potentiel membranaire est alors perturbé et la formation d'ATP est interrompue. La déplétion énergétique massive, la formation de ROS, l'activation de protéases et l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire conduisent alors à une auto-amplification et une potentialisation entrainant une mort cellulaire exagérée. **(Figure 10B)**.

7.1.3. La nécroptose

Ces dernières années, la nécroptose, appelée aussi nécrose programmée, s'est imposée en tant que troisième voie de mort cellulaire avec des caractéristiques communes à l'apoptose et à la nécrose. La nécroptose partage le même activateur que l'apoptose, le TNF-α, mais la finalité est une fuite cellulaire résultant des gonflements des organites et de la cellule (*Luedde et al., 2014*). Cette voie de mort cellulaire est très souvent induite suite à des infections virales et représente par ailleurs une alternative de mort cellulaire quand la voie apoptotique dépendante des caspases est inhibée ou absente (*Han et al., 2011*). L'engagement dans l'apoptose ou la nécroptose est en fait dépendant de deux kinases : RIP1 et RIP3 (Receptor Interacting Protein Kinase 1 ou 3). L'activité de la caspase 8 est également critique car elle favorise l'apoptose en clivant RIP1 et 3, et inhibe ainsi la nécroptose. Le modèle murin Caspase $8^{-/-}$ meurt dès l'embryogenèse par nécroptose embryonnaire (*Kaiser et al., 2011*). La nécroptose est

induite par la liaison du TNF-α à son récepteur le TNF-R1. En absence de la caspase 8, RIP1 s'assemble avec RIP3 constituant le « nécrosome », permettant ainsi la transduction du signal nécroptotique via les protéines telles que MLKL (Mixed Lineage Kinase domain-like) et PGAM5 (mitochondrial phosphatase phosphoglycerate mutase 5) impliquées dans le fonctionnement mitochondrial, comme la production de ROS et la régulation de la concentration du calcium mitochondrial **(Figure 10C)**. De nombreux travaux illustrent par ailleurs qu'en fonction de l'étiologie de l'atteinte hépatique, la réponse nécroptotique fait intervenir des acteurs différents. Par exemple, dans les hépatites auto-immunes induites par la ConA, la délétion de RIP3 semble protectrice, tandis que l'inhibition de RIP1 exacerbe la maladie et est associée à une apoptose massive des hépatocytes, favorisant ainsi la mort des animaux (*Deutsch et al., 2015; Filliol et al., 2016*). Inversement, dans les lésions hépatiques induites par une surcharge en paracétamol (APAP), le blocage de RIP1 ou de RIP3 protège des lésions hépatiques et est associé à une activation plus faible de l'inflammasome NLRP3 (*Dara et al., 2015; Deutsch et al., 2015*). Le rôle de la nécroptose dans le foie et ses pathologies n'est pas encore tout à fait élucidé, mais l'utilisation d'inhibiteurs de RIPK1 tels que la Nécristatine-1 ou Nec-1S et de modèles murins KO tissu-spécifique, apparaissent comme des outils de choix pour disséquer plus finement les mécanismes de cette voie (*Dara et al., 2016; Deutsch et al., 2015; Linkermann and Green, 2014; Zhou et al., 2013*).

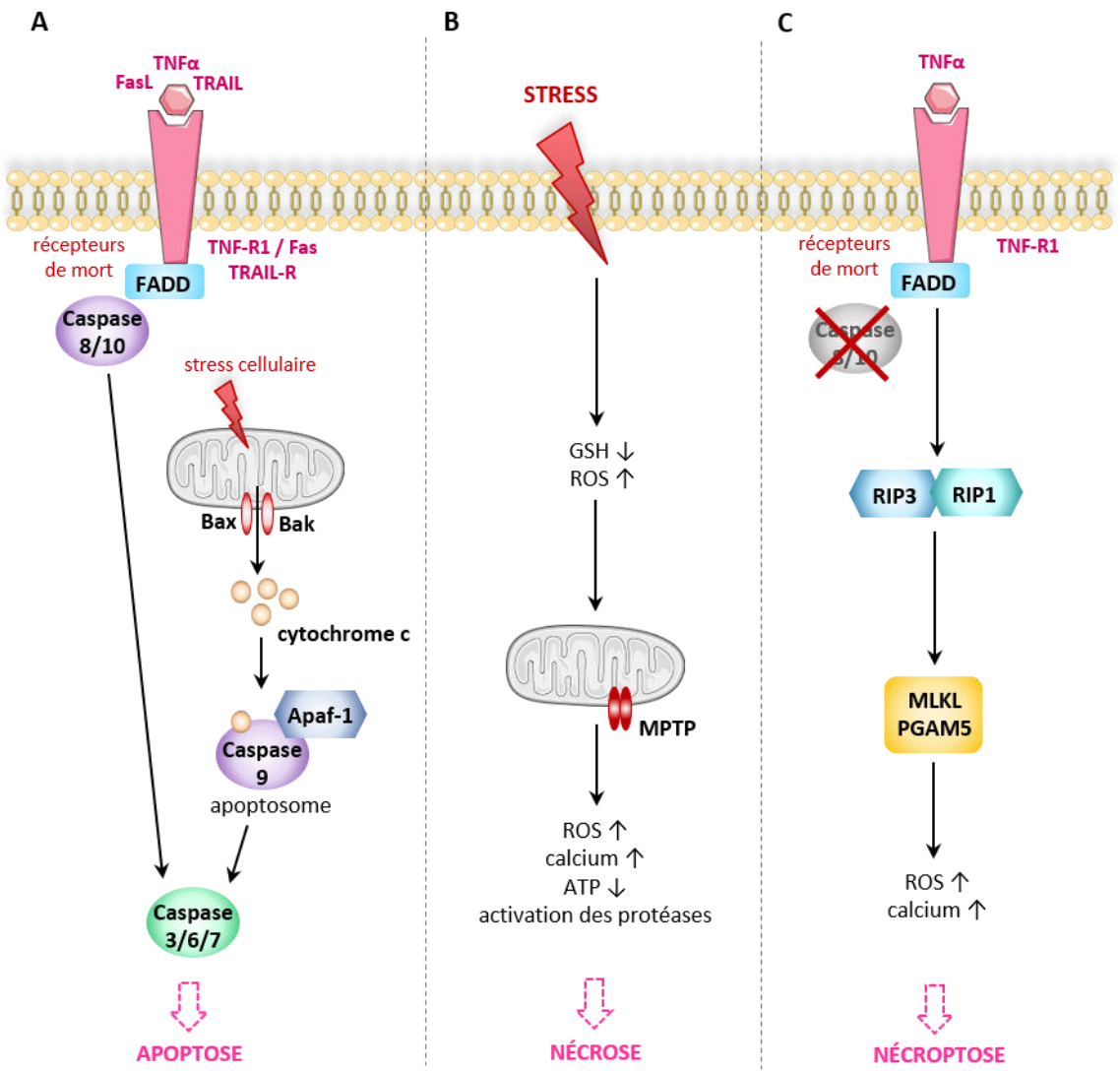


Figure 10. Voies de mort cellulaire principales dans le foie.

A. Apoptose. L'apoptose extrinsèque, médiée par les récepteurs de mort, se distingue de l'apoptose intrinsèque induite par un stress intracellulaire. Les caspases initiatrices (8, 9 et 10) activent les caspases effectrices (3, 6 et 7).

B. Nécrose. La perte de l'homéostasie ionique induit notamment une augmentation du calcium intracellulaire, une perturbation de la perméabilité mitochondriale à cause d'un défaut de la protéine MPTP. Il en résulte l'interruption de la production d'ATP, la formation de ROS, l'activation des protéases. Les composés cellulaires sont relargués dans le milieu sous forme de bulles induisant une forte réponse inflammatoire.

C. Nécroptose. En l'absence de la caspase 8, les kinases RIP3 et 1 sont activées par les récepteurs de mort, entrainant un dysfonctionnement mitochondrial via les protéines MLKL et PGAM5 par exemple.

(Adaptée de *Bantel and Schulze-Osthoff, 2012*)

7.2. Modèles d'agressions aiguës du foie

L'agression hépatique aigüe (ou Acute Liver Injury, ALI) est définie par une nécrose hépatocytaire sévère sans encéphalopathie hépatique (à la différence de l'insuffisance hépatique aiguë, Acute Liver Failure ou ALF) (*Koch et al., 2017*). L'ALI peut être induite par des causes variées, comme les toxines, les virus, un défaut métabolique ou vasculaire, ou bien une origine auto-immune. La moitié des cas

d'ALI sont dus à une overdose d'acétaminophène (APAP, appelé communément paracétamol). Pouvant être traité par un anti-oxydant (le N-acétyl-cystéine, NAC) du fait des mécanismes impliqués (détaillés dans la partie *7.2.1.*), ils ont une meilleure récupération. Les ALI « non-APAP » sont plutôt associées à un pronostic grave puisque seule la transplantation est envisageable.

Différents modèles sont utilisés chez la souris pour mimer au mieux les ALI. Ils sont caractérisés par une importante mort hépatocytaire suivie d'une prolifération compensatrice des hépatocytes restants pour restaurer les fonctions hépatiques. Représentativement aux pathologies humaines, le mode de mort cellulaire impliqué est dépendant du composé utilisé pour induire une ALI.

Les modèles d'APAP et du tétrachlorure de carbone (CCl_4) permettent plus particulièrement l'étude des ALI induites par des produits hépatotoxiques, et seront détaillés dans la suite de cette partie (*cf §7.2.1. et 7.2.2.*). En complément, les modèles par administration de TNF-α/D-galactosamine (D-GalN) et de Concanavaline A (ConA) seront également brièvement présentés (Khan et al., 2017).

7.2.1. Le modèle d'acétaminophène

De par sa fonction de détoxification, le foie est en première ligne pour filtrer les substances toxiques telles que les médicaments. La prise d'APAP, connue pour ses propriétés antalgiques et antipyrétiques, est sans danger sur l'organisme si la dose thérapeutique est respectée (moins de 4 grammes/jour chez l'adulte). La métabolisation de l'APAP par le cytochrome P450 entraine la formation d'un composé toxique, le N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI), qui est ensuite éliminé après conjugaison avec le glutathion (GSH) (**Figure 11**) (*Jaeschke, 2015; Wendel and Feuerstein, 1981*). Cependant, si la quantité d'APAP à assimiler est trop importante, le NAPQI sera en excès. Dans ce cas, ce dernier réagit avec des groupements protéiques sulfhydriles induisant la formation d'adduits protéiques, délétères pour l'organisme. En effet, ces adduits perturbent notamment la chaine de transport des électrons dans la mitochondrie, engendrant alors un fort stress oxydant. Ce dysfonctionnement mitochondrial massif, associé à la désintégration nucléaire, entraine une nécrose cellulaire sévère. Jaeschke et collaborateurs ont ainsi décrit une première phase de mort cellulaire entre 2 et 12 heures post-APAP, accompagnée d'une réponse inflammatoire entre 6 et 24 heures, enfin la régénération a lieu de 24 à 72 heures, chez la souris (*Jaeschke et al., 2011*). La compréhension de ces mécanismes chez la souris a permis de mettre en place un traitement précoce de l'ALI induite par l'APAP chez l'homme. Celui-ci est basé sur la capacité du NAPQI à se lier au GSH. Le NAC étant un substrat de la réaction de métabolisation permettant la formation du GSH, l'administration de ce composé permet ainsi d'augmenter le rendement de conjugaison NAPQI-GSH, qui est ensuite éliminé. L'utilisation du NAC est efficace s'il est administré dans les 8 heures après l'overdose, puis elle diminue dans les 24 heures post-overdose (*Larson, 2007; Saito et al., 2010*).

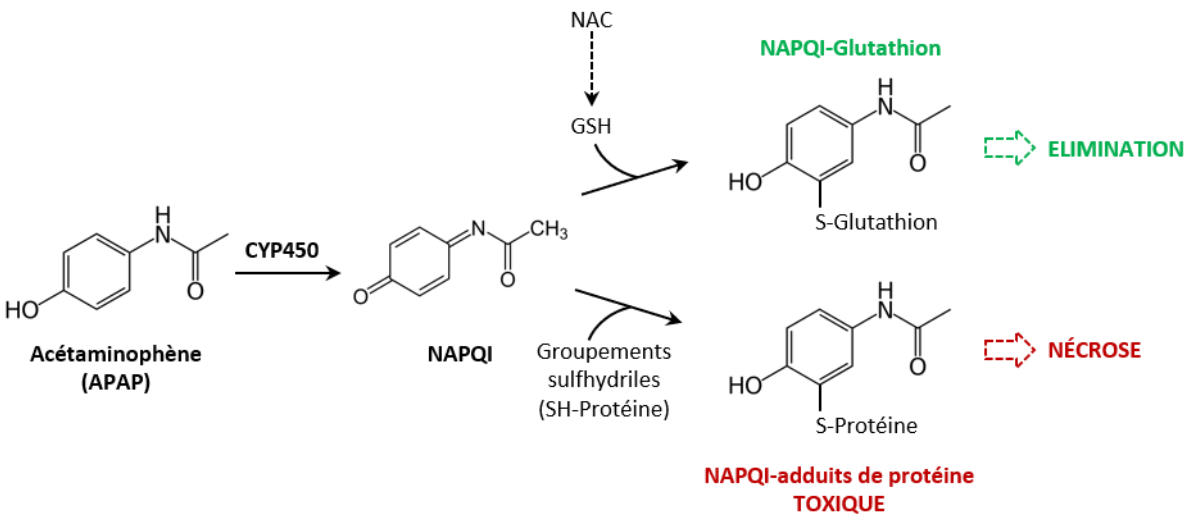


Figure 11. Métabolisation de l'acétaminophène (APAP).

Le cytochrome P450 métabolise l'APAP en NAPQI. Sa conjugaison avec le glutathion permet son élimination. En revanche, les adduits protéiques formés après conjugaison du NAPQI au groupement sulfhydrile sont toxiques et participent à la mise en place de la nécrose cellulaire.

L'identification de biomarqueurs permettrait également de prédire la progression vers l'ALF. La détection des adduits protéiques peut être réalisée dans le foie ou dans le sang, aussi bien des souris que des patients (*Heard et al., 2011; McGill et al., 2013*). De plus, des marqueurs de dommages mitochondriaux directs ou indirects, tels que de l'ADN mitochondrial, la glutamate déshydrogénase (enzyme impliquée dans la matrice mitochondriale) ou encore des fragments d'ADN nucléaires, ont été mesurés dans le plasma des patients (*McGill et al., 2014*). Finalement, plus les dommages mitochondriaux sont importants, plus les chances de survie sont faibles. L'enjeu est maintenant de développer des stratégies thérapeutiques pour les patients qui se présentent trop tardivement après l'overdose grâce à une meilleure connaissance de la phase de régénération. La réponse immunitaire innée est activée en réponse au relargage des DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns), comme les fragments d'ADN mitochondriaux et nucléaires, se liant aux TL-R (récepteurs Toll-like) présents sur les macrophages. Les cellules de Kupffer atténuent alors la réponse directe aux lésions induites, en inhibant les cytokines pro-inflammatoires via la sécrétion d'IL-10 (**Figure 12**) (*You et al., 2013*). Elles favorisent ainsi la régénération de par leur rôle dans le nettoyage de la zone nécrosée. Ces lésions résultent également d'un processus de nécroptose comme l'indique les travaux de Ramachandran et collaborateurs (*Ramachandran et al., 2013*). Le modèle murin déficient pour RIP3 présente une formation d'adduits protéiques similaires aux souris contrôles mais la mort cellulaire est atténuée 6 heures après l'injection d'APAP. Les hépatocytes isolés à partir de la souris $RIP3^{-/-}$ ont une réduction des lésions après 24 heures post-APAP par rapport aux hépatocytes contrôles. RIP3 apparait donc comme un médiateur précoce de l'hépatotoxicité médiée par l'APAP. Enfin, il est intéressant de

souligner que même si la nécrose/nécroptose semblent être les mécanismes prépondérants de mort cellulaire dans le système APAP, de nombreuses études soulignent que l'apoptose pourrait aussi, dans une moindre mesure, participer à cette mort cellulaire. La place de l'apoptose dans l'hépatotoxicité de l'APAP reste cependant très controversée et source de débat dans la littérature (*Jaeschke et al., 2018*).

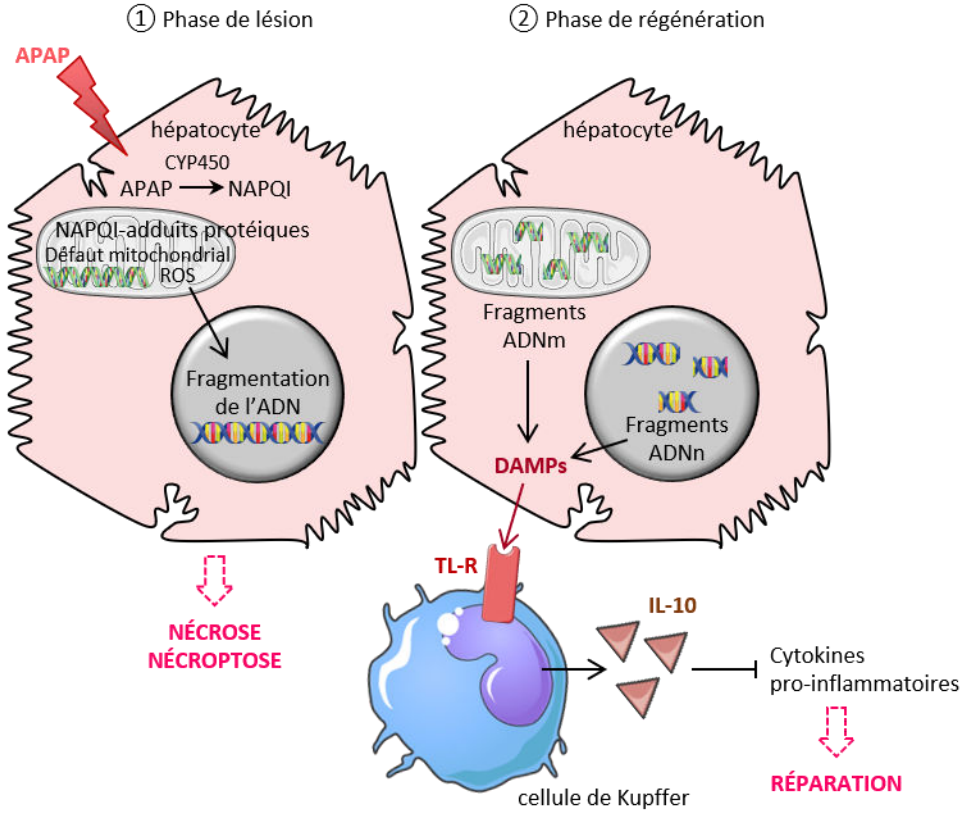


Figure 12. Modèle simplifié de la toxicité de l'APAP.

1. L'APAP est métabolisé en NAPQI par le CYP450. Dans les mitochondries, les adduits protéiques engendrent un stress oxydant qui a ensuite des conséquences sur la désintégration nucléaire. Ceci entraine alors la nécrose cellulaire.

2. Les DAMPs, tels que les fragments d'ADN mitochondriaux et nucléaires, se lient aux récepteurs TL des cellules de Kupffer. Ces macrophages activés sécrètent de l'IL-10, permettent la régulation de la réponse pro-inflammatoire ainsi que la mise en place de la réparation.

(Adaptée de *Woolbright and Jaeschke, 2015*)

7.2.2. Le modèle du tétrachlorure de carbone

Le tétrachlorure de carbone (CCl_4) a été très utilisé dans l'industrie chimique pour ses propriétés de gaz propulseur dans les extincteurs, de réfrigérants, ainsi que de solvants et détachants pour le nettoyage à sec dans les pressings. Cependant, sa toxicité avérée depuis 1987, a conduit au remplacement de ce produit par d'autres dérivés tels que du chloroforme ($CHCl_3$) ou du dichlorométhane (CH_2Cl_2). En effet, de nombreux travaux ont montré un lien de causalité entre

l'exposition à ce produit et le développement de diverses pathologies telles que la maladie de Parkinson (*Goldman et al., 2012*).

Le foie est un organe particulièrement sensible à ce composé chimique puisqu'il contient un grand nombre d'enzymes permettant de le métaboliser. L'utilisation du modèle expérimental de l'exposition des rongeurs au CCl_4 est le plus répandu pour la compréhension de l'hépatotoxicité aiguë ou chronique induite par les produits chimiques. La toxicité induite par le CCl_4 est dépendante de la dose et de la durée de l'exposition (*Scholten et al., 2015*). Ainsi, au cours d'une exposition dite « aiguë » au CCl_4, deux cas de figures sont observés. Soit la dose reçue est faiblement toxique pour l'organisme et il s'en suivra une nécrose hépatocellulaire compensée par une régénération hépatique et la réparation du tissu, permettant alors un retour à l'homéostasie hépatique. En cas de dose fortement toxique, on observe une insuffisance hépatique par excès de nécrose hépatocellulaire non compensée par la régénération hépatique. Par ailleurs, dans le cadre d'une exposition « chronique » au CCl_4, la pathologie s'oriente vers une fibrose, une cirrhose voire un cancer du foie.

La suite de cette partie se focalise plus particulièrement sur le modèle d'agression aiguë, mon projet de thèse reposant sur l'étude du rôle de la protéine p38α dans les hépatocytes murins grâce à ce modèle expérimental. Classiquement, deux grandes phases dans la réponse hépatique induite par le CCl_4 sont décrites (*Mehendale, 2005; Weber et al., 2003*). La première concerne l'initiation des lésions hépatiques à la suite de la genèse des composés réactifs issus de la métabolisation centrolobulaire du CCl_4. Elle conduit alors à la catastrophe nécrotique hépatocytaire associée néanmoins à l'activation de nombreuses voies cellulaires. La seconde débute environ 24 heures après l'injection de CCl_4 et est la phase de récupération et de réparation tissulaire (**Figure 13**). Il est important de noter que bien que la littérature regorge d'études basées sur l'utilisation du modèle d'agression aiguë par le CCl_4 chez les rongeurs et notamment chez le rat, les données issues de ces dernières ne permettent pas d'établir une véritable chronologie précise et détaillée des nombreux évènements cellulaires et moléculaires prenant place au cours de ces deux phases. Dans cette partie, je m'attacherai donc à décrire les processus majeurs observés dans le tissu hépatique suite à l'agression par le CCl_4 en incluant quand cela est possible des repères temporels.

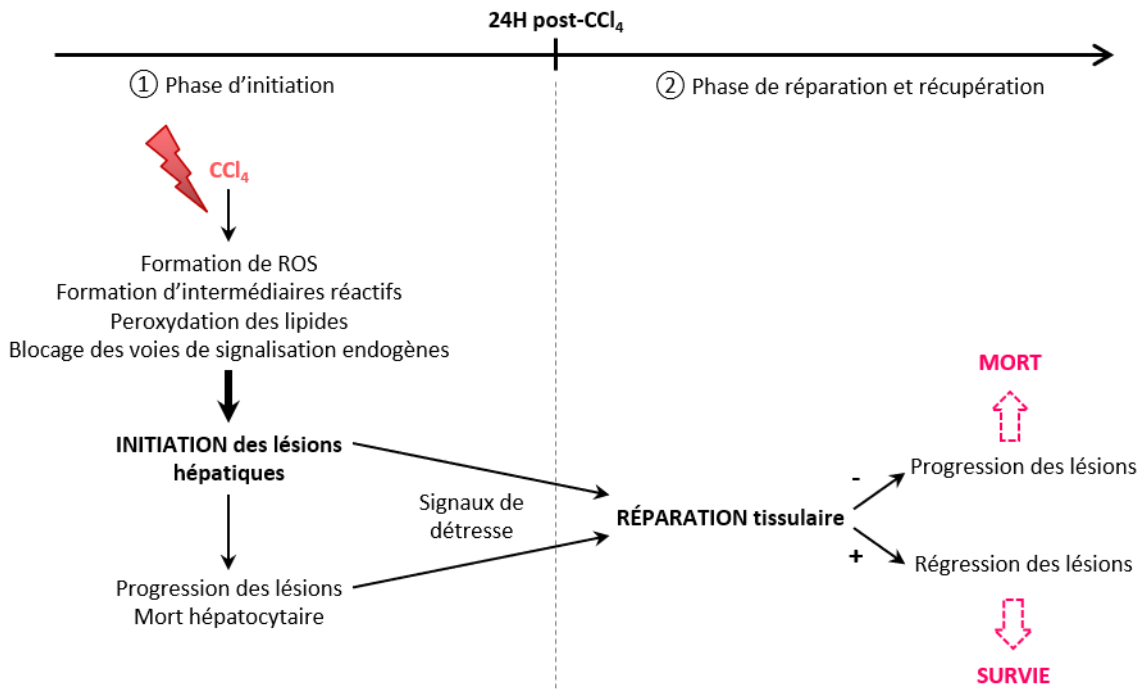


Figure 13. Modèle simplifié de la toxicité induite par le tétrachlorure de carbone (CCl_4).

1. Pendant la première phase, l'application de l'hépatotoxique initie des lésions tissulaires, conduisant à une mort massive des hépatocytes.

2. En réponse aux lésions, une phase de réparation et de récupération est engagée, basée sur une prolifération compensatoire des hépatocyte sains et un remodelage du tissu hépatique. La poursuite du traitement à une dose faible ou modérée conduit à une régression rapide des lésions (meilleure réparation, +) permettant la survie. En revanche, une forte dose inhibe la réparation (-) et entraine une progression incontrôlée des lésions, et par conséquent à la mort.

(Adaptée de *Mehendale, 2005*)

7.2.2.1. Métabolisation du CCl_4 et conséquences cellulaires

Le CCl_4 est métabolisé par le cytochrome P450 (très majoritairement par le CYP2E1, mais peut aussi l'être par le CYP2B1 ou CYP2B2) et forme le radical libre trichlorométhylé, $CCl_3^{\cdot}$. Il est intéressant de noter que l'application de faibles doses répétées de CCl_4 entraine l'inactivation « par suicide » de ces enzymes et ainsi la protection contre les dommages hépatiques engendrés (*Manno et al., 1992*). Le $CCl_3^{\cdot}$ peut réagir avec différentes substances biologiques comme les acides aminés, les nucléotides, les protéines ou les acides gras par exemple. Il est ensuite converti en $CCl_3OO^{\cdot}$ par réaction avec une espèce hautement réactive de l'oxygène (ROS). Ce radical est hautement réactif et sa faible durée de vie l'amène à soustraire un atome d'hydrogène aux acides gras polyinsaturés initiant le processus de peroxydation des lipides (*Weber et al., 2003*). Ce dernier endommage les fonctions cellulaires par perturbation de la perméabilité membranaire plasmique, du RE ou de la mitochondrie ou par liaisons covalentes des intermédiaires réactifs formés lors de la métabolisation causant une hypométhylation des composants cellulaires et une dérégulation de l'homéostasie du calcium. Selon la dose et la durée

de l'exposition au CCl_4, les conséquences peuvent être réversibles ou finalement engendrer la mort cellulaire (**Figure 14**) (*Janakat and Al-Merie, 2002*).

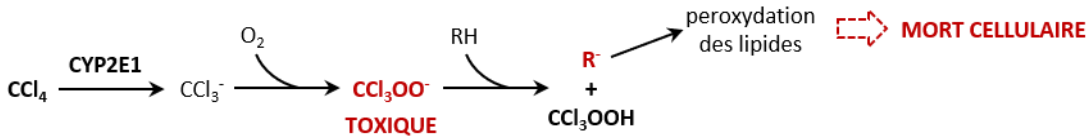


Figure 14. Métabolisation du CCl_4.

Le cytochrome P2E1 métabolise le CCl_4 en CCl_3^-. Sa réaction avec des ROS induit la formation du CCl_3OO^-. Ce composé hautement réactif soustrait alors un atome d'hydrogène à des substances biologiques, principalement les acides gras insaturés (RH). En conséquence, le processus de peroxydation des lipides est initié, entrainant la mort cellulaire.

7.2.2.2. Morts cellulaires induites par le CCl_4

Le mode de mort cellulaire des hépatocytes dans le modèle d'agression aiguë au CCl_4 est assez discuté, il semblerait que l'apoptose et la nécrose interviennent simultanément (*Sun et al., 2001*). La mesure des ALT et AST sériques (reflet de la mort hépatocytaire) ainsi que l'observation histologique du tissu hépatique dans ce modèle indiquent une initiation de ces processus dès 3 heures post-CCl_4, l'apparition d'une mort cellulaire plus importante en zone péri-veineuse à 12 heures et une majoration de ces derniers entre 24 et 48 heures après l'exposition au composé toxique (*Knockaert et al., 2012; Weber et al., 2003*). Une étude menée chez le rat suggère que les dommages de la chaine respiratoire mitochondriale et les désordres métaboliques du calcium pourraient être les principales causes de l'activation de ces processus de mort cellulaire. Par ailleurs, une diminution de la quantité de la vitamine C anti-oxydative et de différents enzymes régulant le niveau des ROS, est observée entre 18 et 24 heures indiquant un rôle du stress oxydatif dans l'activation de ces processus (*Cai et al., 2005; Knockaert et al., 2012*).

7.2.2.3. Inflammation, prolifération hépatocytaire et remodelage hépatique

Afin de compenser la mort cellulaire massive induite par le CCl_4, le foie doit produire une réponse pro-prolifératrice forte pour permettre aux hépatocytes sains restants de proliférer. Ces derniers commencent à proliférer 24 heures après l'agression au CCl_4, la prolifération est majorée aux environs de 48 heures et se terminent vers 72 heures post-CCl_4. Par ailleurs, pour assurer un retour complet à l'homéostasie tissulaire, un remodelage architectural du foie doit aussi avoir lieu. Ces réponses spécifiques mettent en jeu un dialogue dynamique entre les hépatocytes lésés et sains, mais aussi les cellules non parenchymateuses (*Ju and Tacke, 2016; Khan et al., 2017*).

Suite à leur agression et au développement de dommages intracellulaires, les hépatocytes lésés relarguent différentes molécules telles que les DAMPs. Ces dernières favorisent l'activation des cellules

inflammatoires (cellules résidentes du foie et cellules recrutées). Ces dernières contribuent alors à la progression des atteintes hépatiques dans un premier temps, mais aussi au processus de régénération et de remodelage des zones endommagées du tissu hépatique dans un second temps. Les macrophages résidents du foie, les cellules de Kupffer, représentent une cible privilégiée des DAMPs et sont activées dès 24 heures après injection de CCl_4. Ces cellules participent à la réponse pro-inflammatoire en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-6, IL-1β), des chimiokines et des ROS (*Kiso et al., 2012*). Le relargage de TNF-α et sa fixation sur les récepteurs TNF-R1/2 des hépatocytes favorise notamment l'apoptose de ces derniers. La sécrétion d'IL-1β et de chimiokines (CXCL2 et 8) permet le recrutement massif de neutrophiles au site de lésion tissulaire. Ces neutrophiles en sécrétant des ROS et diverses protéases induisent la nécrose des hépatocytes. La sécrétion d'IL-6 quant à elle permet l'expression de multiples gènes impliqués dans le cycle cellulaire et facilite alors la prolifération des hépatocytes sains. Par ailleurs, en plus des cellules de Kupffer, les hépatocytes lésés et les cellules étoilées sécrètent des chimiokines telles que le CCL2, favorisant alors le recrutement de monocytes Ly-$6C^{hi}$ dans le foie et donc l'expansion du pool de macrophages résidents du foie. Les lymphocytes T résidents et recrutés ainsi que les cellules NK participent aussi à l'activation des macrophages via la sécrétion d'IFN-γ. En retour, les cellules de Kupffer activent également les cellules NK et leur recrutement par la production d'IL-12 et 18. Ces cellules NK participent à l'apoptose hépatocytaire en activant notamment la voie Fas Ligand.

La phagocytose des cellules mortes permet l'initiation de la résolution de l'inflammation et la restauration du tissu hépatique. En effet, lors de la phagocytose, on assiste à une polarisation des macrophages vers un phénotype dit « restoratif » (Ly6^{low}) avec production de médiateurs anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou l'IL-1Ra (IL-1 Receptor Antagonist). L'IL-10 contrôle l'infiltration des neutrophiles mais intervient aussi en limitant la prolifération hépatocytaire et le développement de la fibrose pendant la phase de récupération (*Louis et al., 1998*). Par ailleurs, les cellules étoilées et endothéliales jouent aussi des rôles cruciaux dans la prolifération hépatocytaire en sécrétant de l'HGF. Concernant le remodelage des sinusoïdes hépatiques après l'agression hépatique, les cellules étoilées activées par l'inflammation se différencient en myofibroblastes qui prolifèrent et produisent des fibres de collagène et de la matrice extracellulaire, via l'activation de la voie TGF-β. Ce processus est important puisque cette matrice extracellulaire sert aussi de support pour la prolifération des hépatocytes, mais il doit être limité dans le temps pour éviter toute formation de tissu fibrotique en excès, comme cela est le cas en cas d'exposition chronique au CCl_4.

L'ensemble des processus que nous venons de décrire et cette coopération intercellulaire permettent ainsi un retour à l'homéostasie hépatique en moins de 7 jours après l'agression aiguë au CCl_4.

7.2.3. Autres modèles

Les insuffisances hépatiques aiguës ne sont pas seulement induites par des produits hépatotoxiques chimiques, mais aussi par des virus ou peuvent avoir une origine auto-immune (Khan et al., 2017). Ainsi, différents modèles d'étude ont été développés chez la souris pour pouvoir caractériser les réponses cellulaires et mécanismes sous-jacents à ces agressions. On peut notamment citer les modèles d'injection de TNF-α/D-Galactosamine (GalN) et de Concanavaline A (ConA).

(1) Le modèle d'injection de TNF-α/D-GalN induit une insuffisance hépatique aiguë médiée par les ligands de mort cellulaire. Ce système induit un choc systémique accru et une insuffisance hépatique entrainant un phénomène d'apoptose (*Sun et al., 2001*). La toxicité du sucre aminé GalN entraine une diminution drastique du pool d'uridine, conduisant ainsi à une réduction de la synthèse des molécules d'ARN et de protéines et altérant les fonctions cellulaires. Par ailleurs, ce mécanisme de toxicité augmente la porosité de la membrane cellulaire conduisant alors à la mort cellulaire (*Bradham et al., 1998*). Le récepteur 1 du TNF-α (TNF-R1) est essentiel dans ce modèle puisque son absence entraine la résistance au traitement par le TNF-α/D-GalN (*Bradham et al., 1998*). Ce modèle a des caractéristiques communes avec les insuffisances hépatiques aiguës induites par les virus (apoptose et implication des TNF-R) (*Zang et al., 2000*).

(2) Le modèle d'injection de ConA, une lectine se liant aux résidus mannose de différentes glycoprotéines, induit une réaction immunitaire importante et une atteinte hépatique ayant de fortes similitudes avec une hépatite virale simple ou une hépatite auto-immune humaine (*Ye et al., 2018*). La ConA se lie aux cellules étoilées, aux cellules de Kupffer, aux lymphocytes T CD4+ et au NKT, induisant une réponse inflammatoire majeure suivie de lésions hépatiques sévères. La stimulation de ces cellules entraine la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α, l'IFN-γ, l'IL-6, l'IL-12, l'IL-18 et de chimiokines (*Heymann et al., 2015*). Le système perforine-granzyme joue un rôle essentiel dans la mort cellulaire induite par la ConA et ceci passe notamment par un relargage excessif l'IFN-γ (*Watanabe et al., 1996*). Les souris déficientes pour l'IFN-γ ne développent d'ailleurs pas d'hépatite après un traitement à la ConA, démontrant le rôle critique de ce dernier dans la toxicité du modèle (*Tagawa et al., 1997*). Récemment, en plus des processus de nécrose, la nécroptose a également été décrite dans le contexte du modèle ConA (*Filliol et al., 2016*). L'utilisation d'inhibiteurs des voies de nécroptose limite les atteintes hépatiques après traitement par la ConA et pourraient donc constituer un outil thérapeutique dans le traitement des hépatites auto-immunes (*Arshad et al., 2015*).

Ainsi, nous avons pu voir dans cette partie que l'hépatotoxicité peut être expérimentalement induite par divers composés chimiques, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, permettant d'étudier des aspects spécifiques des ALI humaines. Certains modèles miment fidèlement les processus entiers d'ALI

observés chez les patients, c'est le cas de l'APAP, tandis que d'autres permettent plutôt l'analyse d'évènements particuliers de la pathologie humaine. La compréhension de ces mécanismes est essentielle afin d'envisager de nouvelles thérapies, surtout passé les premières heures après l'overdose et empêcher une dérive vers l'insuffisance hépatique aiguë, pathologie rare mais sévère avec une mortalité élevée et des complications comme la septicémie, la défaillance des organes et l'hypertension intracrâniale (*Wang et al., 2013a*).

RESUME DU CHAPITRE 1

Nous avons pu voir dans ce premier chapitre que le foie est un organe fascinant.

- Son rôle est central dans l'organisme de par ses fonctions variées de filtre, de sécrétion ou encore dans les différentes voies métaboliques par exemple.
- Le foie est particulièrement original. Sa polyploïdisation physiologique hépatocytaire, dont la fonction reste encore à déterminer, peut être modulée lors du développement ou dans les processus pathologiques.
- La régénération est une caractéristique essentielle du foie. Alors que ce dernier est normalement quiescent, il a la capacité de ré-entrer en prolifération en réponse à divers stimuli, permettant ainsi de maintenir l'homéostasie hépatique.
- L'homéostasie est également finement régulée en jouant sur la balance prolifération/mort cellulaire, via notamment un dialogue permanent entre les hépatocytes et les cellules du microenvironnement immunitaire hépatique. Ce dialogue particulier permet ainsi le maintien de l'équilibre entre la perte et le renouvellement des hépatocytes, pouvant être perturbé lors de l'overdose d'hépatotoxiques.

Chapitre 2 :

La MAP KINASE p38

Une cellule a constamment besoin de s'informer des changements intervenant dans le milieu extracellulaire. Pour cela, elle doit donc être capable de recevoir des signaux, transmettre l'information aux différents organites et enfin de répondre de façon appropriée. Chez les mammifères, la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) est maintenant largement décrite pour permettre la transduction des signaux extracellulaires et adapter la réponse en conséquence, que soit la prolifération, l'apoptose, la réponse immunitaire ou encore la différentiation. Elle est par ailleurs très conservée du point de vue de l'évolution et est présente de façon ubiquitaire dans toutes les cellules eucaryotes. Historiquement, ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) 1 et 2 ont été les premières protéines décrites comme étant impliquées dans la signalisation induite par les facteurs de croissance (mitogènes), donnant ainsi le nom à la famille de protéines « activées par les mitogènes » (*Boulton et al., 1991*). Quatre sous-groupes la composent, établis en fonction des stimuli extracellulaires et des acteurs impliqués : les ERK1/2, la kinase activée par le stress JNK (c-Jun N-terminal Kinase, aussi appelée SAPK, Stress-Activated Protein Kinase), ERK5 (ou BMK1 pour Big MAP Kinase) plus spécifique du système neural et cardio-vasculaire et enfin le groupe des protéines p38.

Lors de mes travaux de thèse, j'ai étudié le rôle de la MAPK p38α dans un contexte d'agression aiguë du foie induite par le tétrachlorure de carbone (CCl_4), associant notamment signaux prolifératifs, stress oxydant et réponse inflammatoire. La MAPK p38 fait l'objet de ce second chapitre.

1. Caractéristiques de la MAP Kinase p38

1.1. Structure et isoformes

La famille des MAPK p38 est constituée de 4 isoformes issues de l'expression de gènes différents : p38α (MAPK14), p38β (MAPK11), p38γ (MAPK12) et p38δ (MAPK13) (**Table 1**) (*Jiang et al., 1996, 1997; Li et al., 1996*). Chronologiquement, la première isoforme isolée a été p38α, initialement appelé p38, rapidement phosphorylée en réponse à une stimulation par le LPS (lipopolysaccharide) (*Han et al., 1994*). Cette même étude a permis de mieux comprendre le rôle de p38α grâce à la découverte d'homologies avec la protéine Hog1 de *Saccharomyces cerevisiae*, important régulateur de la réponse osmotique. En parallèle, des travaux parus la même année ont permis la mise en évidence d'une de ses cibles, la MK2 (MAPK-activated protein kinase 2), dans des cellules stimulées par un choc thermique ou par de l'IL-1 (*Freshney et al., 1994; Rouse et al., 1994*). Par ailleurs le groupe de Lee a identifié p38α comme cible principale de médicaments anti-inflammatoires à base d'imidazole-pyridine, dont le SB203580 (*Lee et al., 1994*). Les séquences en acides aminés des protéines p38α et p38β sont proches à 75%, celles de p38γ et p38δ à 70% entre elles. En revanche, p38γ et p38δ ne partagent qu'environ 60% d'identité avec p38α (*Cuenda and Rousseau, 2007*). L'expression de ces isoformes diffère selon le tissu considéré (**Table 1**). Alors que p38α et p38β sont exprimées de façon

ubiquitaire mais avec une expression prépondérante pour p38α, p38γ et p38δ sont plus tissu-spécifique. A titre d'exemples, p38β est fortement exprimée dans le cerveau, p38γ dans les muscles squelettiques et p38δ dans les glandes endocrines ou les poumons. Afin d'établir leur fonction propre, des modèles murins de délétion spécifique de chaque isoforme ont été générés. L'étude de p38α nécessite des modèles conditionnels puisque la souris p38α$^{-/-}$ présente une létalité embryonnaire résultant d'un défaut placentaire (*Adams et al., 2000; Mudgett et al., 2000*). De plus, une délétion de p38α dans les lignages embryonnaires entraine une mort après la naissance causée par des anomalies dans les poumons (*Hui et al., 2007a*). Les souris dépourvues d'expression de p38β sont totalement viables mais présentent une réduction de la masse osseuse (*Beardmore et al., 2005*).Les souris p38δ$^{-/-}$ ou p38γ$^{-/-}$ sont, quant à elles, viables, fertiles et n'ont pas de problèmes de santé majeurs apparents (*Sabio et al., 2005*). L'utilisation de ces modèles a permis de montrer une certaine redondance fonctionnelle des isoformes (notamment entre p38α et p38β d'une part, et p38γ et p38δ d'autre part) mais aussi qu'elles possèdent généralement les mêmes activateurs et les mêmes substrats, avec cependant des niveaux d'activation différents. Ce thème d'étude reste toujours d'actualité permettant ainsi de déceler les subtilités de chaque isoforme.

Isoforme	p38α	p38β	p38γ	p38δ
autres noms	p38, MAPK14	p38-2, MAPK11	MAPK12, ERK6, SAPK3	MAPK13, SAPK14
localisation chromosomique chez l'homme / la souris	6 / 17	22 / 15	22 / 15	6 / 17
nombres d'acides aminés	360	364	367	366
poids moléculaire (kDa)	38	39	43	40
expression tissulaire prédominante	ubiquitaire	ubiquitaire mais fortement exprimé dans le cerveau	muscle squelettique	poumon, rein, testicule, pancréas, intestin grêle
modèle murin déficient	létalité embryonnaire (défaut placentaire)	viable avec réduction de la masse osseuse	viable sans problème de santé majeur	viable sans problème de santé majeur

Table 1. Propriétés des quatre isoformes de la famille des MAPKs p38.
(Adaptée de *Ono and Han, 2000*)

Comme toutes les MAPKs, elles possèdent un site de phosphorylation caractérisé par une thréonine et une tyrosine placées dans une structure en boucle. Le motif spécifique des p38 est une thréonine localisée en position 180, suivie d'une glycine, puis de la tyrosine en position 182 (TGY), permettant leur double phosphorylation et ainsi leur activation (*Hanks and Hunter, 1995*). Par ailleurs, elles ont également un site D (pour « docking site » ou « site d'accostage »), permettant une interaction spécifique avec les MAP2Ks (MAP Kinase Kinase) en amont (*Tokunaga et al., 2014*). (**Figure 15**)

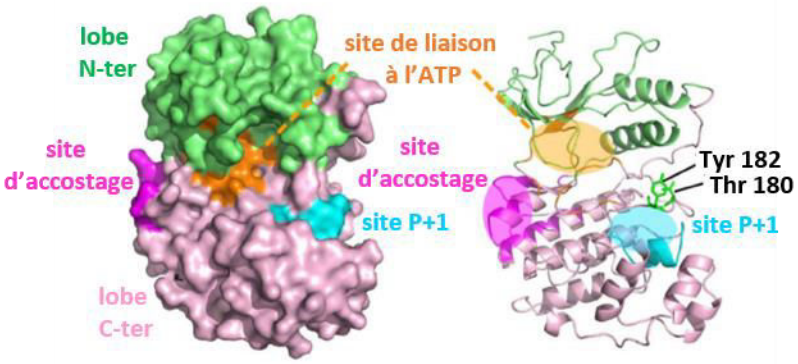


Figure 15. Représentation de la surface (à gauche) et en rubans (à droite) de la structure de p38α.
Les lobes N-ter et C-ter sont respectivement en vert et rose. Les thréonine 180 et tyrosine 182 sont représentées par des structures en bâtons vertes sur le panel de droite. Les cercles orange, bleu et magenta correspondent respectivement au site de liaison à l'ATP, au site P+1 et au site d'accostage. (Adaptée de *Tokunaga et al., 2014*)

Dans la suite de cette partie, certaines études ne permettent pas de différencier les isoformes ou bien le modèle utilisé impacte plusieurs isoformes. Dans ce cas, le terme p38 est utilisé de façon générique. Les isoformes sont précisées lorsqu'elles sont clairement spécifiées et identifiées dans les publications.

1.2. La voie de signalisation de la MAPK p38

La voie de signalisation de la MAPK p38 est un vaste réseau. En effet, de nombreux acteurs participent à la transduction des signaux extracellulaires vers le noyau et ce, à tous les niveaux de la signalisation. De multiples stimuli peuvent l'activer, induisant alors une cascade de phosphorylation. Communément à toutes les MAPKs, le stimulus perçu entraine dans un premier temps l'activation de petites GTPases, telles que Rac ou Cdc42, ou de récepteurs (les TRAFs par exemple). Ceux-ci phosphorylent ensuite les MAP3Ks (MAP Kinase Kinase Kinase ou MAPKKKs) les activant. Ces dernières phosphorylent à leur tour les MAP2Ks (MAP Kinase Kinase ou MAPKKs) qui phosphorylent les MAPKs (Erk1/2, JNK, p38, Erk5). Enfin, les MAPKs ainsi activées phosphorylent les substrats adéquats, effecteurs cytoplasmiques ou nucléaires ciblant les réponses cellulaires adaptées (prolifération, différentiation, apoptose ou bien survie par exemple). La signalisation de p38 est particulièrement complexe puisque tout dépend du stimulus et du type cellulaire considéré (**Figure 16**).

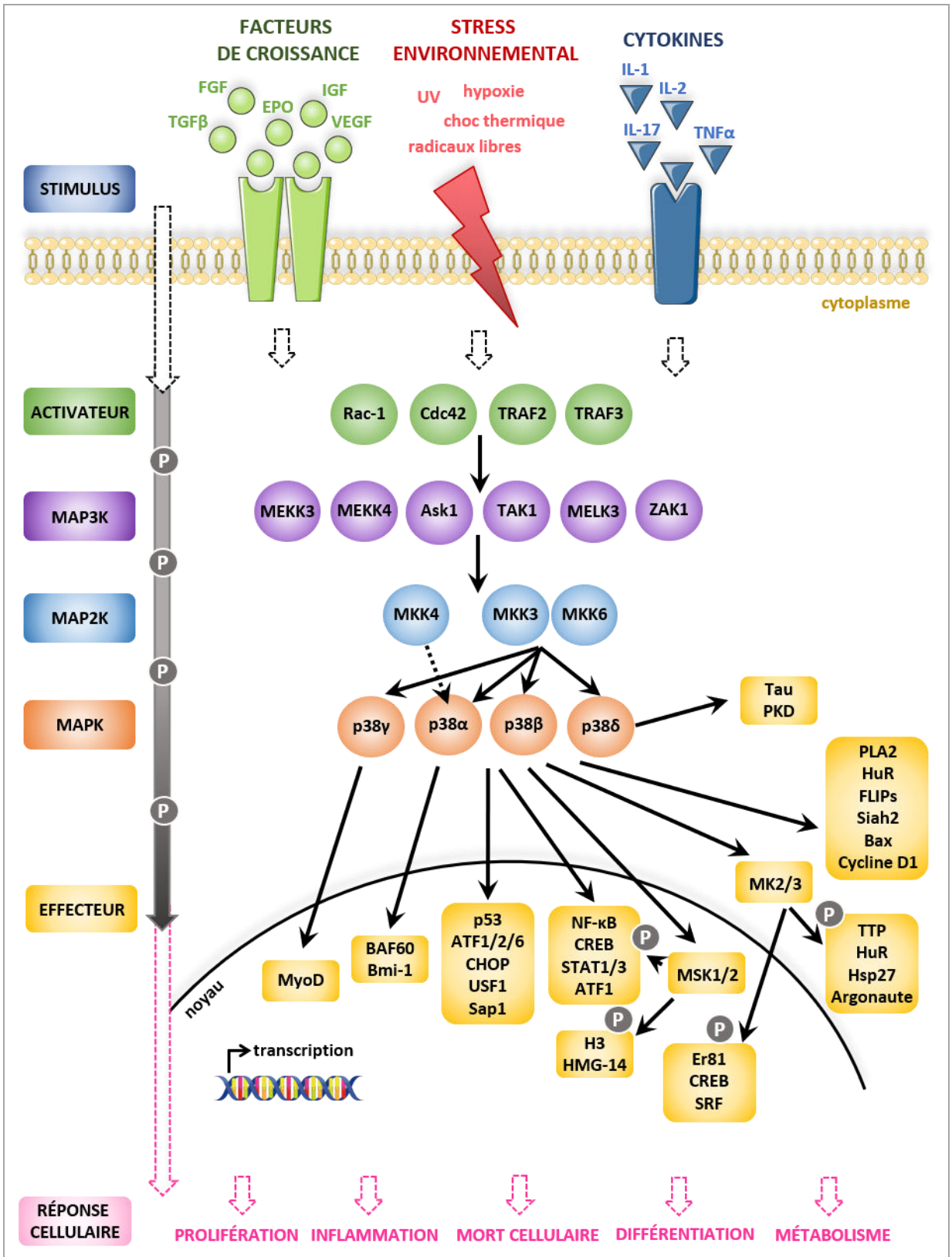


Figure 16. Représentation schématique de la voie de signalisation des MAPKs p38.

En réponse aux stimuli, les activateurs, p38, puis les effecteurs sont activés pour induire une réponse cellulaire appropriée. L'ensemble des protéines représentées n'est pas exhaustif.

(Adaptée de *Cuadrado and Nebreda, 2010*)

1.2.1. Les activateurs en amont de p38

Une multitude de signaux extracellulaires sont impliqués dans l'activation de la voie de signalisation p38. Ainsi, les facteurs de croissance, les stress environnementaux (tels que les UVs, un choc thermique, l'hypoxie ou les ROS), les cytokines ou encore certains pathogènes (viraux, bactériens ou bien microbiens par exemple) activent les petites GTPases (Rac ou Cdc42) et les récepteurs TRAFs induisant ensuite une réaction en chaine de phosphorylations. Un certain nombre de MAP3Ks sont alors activées : TAK1 (TGFβ-Activated Kinase 1), ASK1 (Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1), DLK1 (Dual-Leucine-zipper-bearing Kinase 1), MEKK3 et 4 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 ou 4) ou encore ZAK1 (Leucine-Zipper and sterile-α-motif Kinase 1) pour n'en citer que quelques-unes. Il est important de noter que certaines MAP3Ks sont communes aux voies de signalisation de p38 et de JNK, comme ASK1, TAK1, MEKK4 par exemple.

Bien que les stimuli et les effecteurs puissent s'entrecroiser, certains liens spécifiques ont cependant été mis en évidence. Par exemple, dans des lignées de cellules S2 de Drosophile, selon le signal perçu, le nombre de MAP3Ks impliquées diffère pour permettre une activation maximale de p38 : l'irradiation par les UV implique seulement MEKK1, tandis qu'un choc thermique active conjointement MEKK1 et ASK1 ; une hyperosmolarité, quant à elle, nécessite l'activation de quatre MAP3Ks, MEKK1, ASK1, TAK1 et MLK, maximisant ainsi l'activation de p38 (*Zhuang et al., 2006*). Chez les mammifères, ASK1 est la MAP3K majeure en réponse au stress oxydant (*Matsukawa et al., 2004*). La dissociation de la thioredoxine oxydée par les radicaux libres et de ASK1 permet à cette MAP3K, une fois activée par autophosphorylation, d'activer la voie de p38 et d'envoyer un signal pro-apototique (*Tsuchiya et al., 2015*). D'autre part, la signalisation TGFβ est impliquée dans l'activation de TAK1, MAP3K en amont de p38 (*Sorrentino et al., 2008*). A la suite d'un signal TGFβ, les récepteurs (Tβ-R) se dimérisent, puis l'interaction entre le Tβ-R1 (récepteur de type 1) et l'ubiquitine ligase TRAF6 entraine l'auto-ubiquitinylation de cette dernière. Enfin, TRAF6 ubiquitinylée s'associe avec TAK1 pour l'activer et ainsi engendrer la cascade de phosphorylation en aval, ayant pour finalité la mort cellulaire par apoptose. (**Figure 16**, MAP3Ks en violet).

Dans un deuxième temps, les MAP3Ks induisent l'activation des MAP2Ks par la phosphorylation d'une sérine et d'une thréonine localisées dans une boucle d'activation. Nous avons pu voir que l'activation de la MAP3K dépend du stimulus perçu, ce qui favorise alors l'implication d'une MAP2K plutôt qu'une autre. Par exemple, il a été montré que TAK1 agit sur MKK3 et 6 (*Moriguchi et al., 1996*). MKK6 est également activé par ASK1 dans des conditions de stress oxydatif (*Sturchler et al., 2010*). Récemment, Pattison et collaborateurs ont montré que le complexe IKK2/NF-κB/TPL-2 (Tumour Progression Locus 2), en aval de TAK1, peut activer directement MKK3/6 lors de la réponse immunitaire innée (*Pattison et al., 2016*). En effet, l'activation de TAK1, suite à une stimulation des macrophages par le LPS ou le TNF, induit l'activation du complexe IKK2/NF-κB/TPL-2. L'activité catalytique de ce dernier permet la

phosphorylation de MKK3/6, et finalement p38α. Ces travaux révèlent ainsi que TPL-2 est nécessaire pour l'activation optimale de p38α et permettre ainsi la mise en place d'une réponse immunitaire innée efficace.

Les MAP2Ks constituent le dernier niveau d'activation en amont de p38, avec laquelle elles sont directement en relation (**Figure 16**, MAP2Ks en bleu).

1.2.2. Phosphorylations de p38

De manière canonique, l'activation de p38 dépend de la double phosphorylation du motif TGY situé au niveau d'une boucle activatrice. Pour ce faire, des thréonine/tyrosine kinases entrent en jeu, ce sont les MAP2Ks. MKK3 et MKK6 sont spécifiques de l'activation de p38. Partageant 80% d'homologie, elles ont une certaine redondance fonctionnelle pendant le développement comme le montre l'utilisation de modèles murins knock-out (KO) (*Brancho et al., 2003; Moriguchi et al., 1996*). En effet, les deux souris sont viables et sans problème majeur de santé, mais le double KO MKK3/6 meure à l'état embryonnaire d'un défaut placentaire. Une étude sur des fibroblastes issus des souris KO MKK3 ou 6 a montré que l'activation de p38 par l'une ou l'autre des MKKs est dépendante du stimulus considéré (*Remy et al., 2010*). MKK3 et 6 sont essentielles pour l'activation de p38β et γ en réponse à un stress cellulaire tandis que p38δ est plus activée en réponse à un choc hyperosmolaire. En revanche, MKK6 est l'activateur majeur de p38δ après stimulation par le TNFα. Concernant p38α, elle peut aussi bien être activée par MKK3 ou 6, mais aussi par MKK4 (qui est normalement l'activateur préférentiel de JNK) en réponse à une irradiation par les UVs. Par ailleurs, la durée et l'intensité du signal est également à prendre en compte. Par exemple, une faible activité catalytique de MKK6 active p38α dans les ovocytes de xénope, mais pas les autres isoformes (*Alonso et al., 2000*). La régulation de l'activation de p38 n'est pas seulement dépendante du type, de la durée et de l'intensité du signal, mais aussi du contexte cellulaire considéré dans lequel la quantité des MAP2Ks varie (due en partie aux MAP3Ks qui sont aussi cellule-spécifique). Par exemple, MKK4 semble être activée dans des conditions avec un niveau bas de MKK3 ou MKK6 (*Tanaka et al., 2002*). (**Figure 17**)

Fait intéressant, les lymphocytes T utilisent un mécanisme d'activation de p38α non-canonique, indépendant des MKKs (*Salvador et al., 2005a*). La stimulation par le TCR induit la phosphorylation de p38α sur sa tyrosine 323 par la tyrosine-kinase ZAP70 (ζ-chain-associated protein kinase 70), impliquant l'autophosphorylation du motif TGY dans la boucle activatrice. GADD45 apparait comme un inhibiteur de cette voie alternative en se liant à p38α et empêchant la phosphorylation de la tyrosine 323 (*Salvador et al., 2005b*). Récemment, les travaux de la même équipe ont montré que, suite à son activation, p38α est également capable en retour de phosphoryler ZAP70, réduisant la durée de la stimulation par le TCR (*Giardino Torchia et al., 2018*). Par conséquent, cette boucle de

rétrocontrôle négative permet de limiter les réponses excessives des cellules T, comme la sécrétion de cytokines et la cytotoxicité (**Figure 17**).

Un troisième mécanisme médié par la protéine chaperonne TAB1 (TGFβ-Activated kinase 1) et indépendant des MKKs a également été découvert (*Ge et al., 2002*). TAB1 interagit avec p38α entrainant un changement conformationnel et permettant alors son autophosphorylation sur sa thréonine 180 et sa tyrosine 182 (*Thapa et al., 2018*). Ce mécanisme a notamment été décrit lors de l'ischémie cardiaque, pendant laquelle p38α est associée à TAB1 (*Tanno et al., 2003*). L'importante activation de p38α en retour a des effets néfastes sur les cardiomyocytes puisque ceux-ci meurent par apoptose (**Figure 17**).

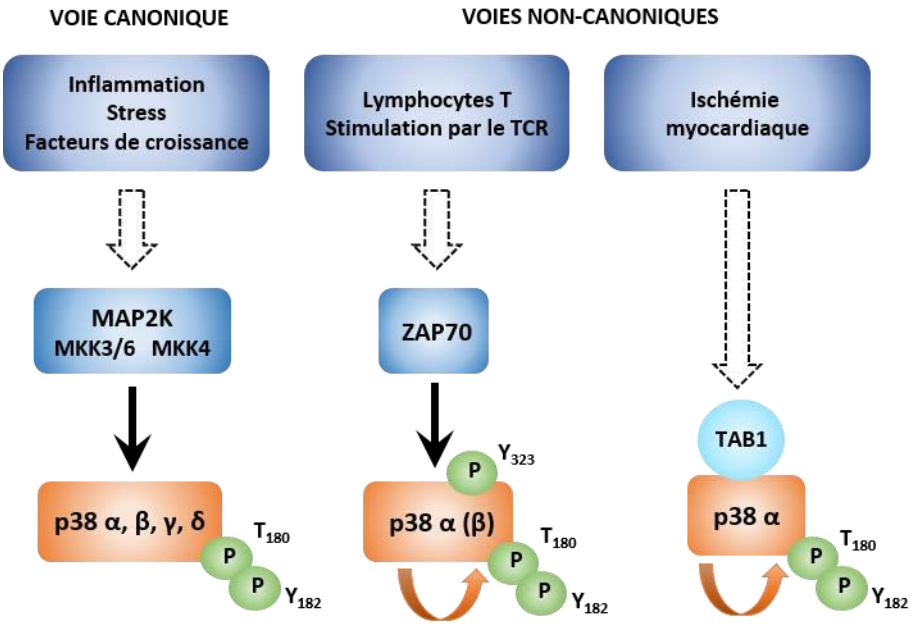


Figure 17. Représentation schématique des mécanismes de phosphorylation de p38.

La voie canonique implique les MAP2Ks qui phosphorylent p38 sur son double site thréonine 180 et tyrosine 182 situé dans une boucle activatrice. Dans les lymphocytes T, la kinase ZAP70 phosphoryle p38 sur sa tyrosine 323, entrainant son autophosphorylation (flèche orange). Lors de l'ischémie cardiaque, TAB1, une protéine chaperonne, est associée à p38α induisant son autophosphorylation (flèche orange) dans la boucle activatrice. (Adaptée de *Cuadrado and Nebreda, 2010*)

1.2.3. Les inhibiteurs

En conditions physiologiques, l'activation de la MAPK p38 est transitoire afin de réguler au mieux l'intensité du signal reçu et la réponse associée. L'une des manières la plus directe pour mettre fin à l'activité catalytique de p38 est de déphosphoryler au moins un des deux sites (la thréonine ou la tyrosine) de la boucle activatrice. En effet, la phosphorylation de la tyrosine 182 seule n'est pas suffisante pour activer p38α et la phosphorylation de la thréonine 180 confère une activité 10 à 20 fois moins importante que dans le cas de la double phosphorylation (*Zhang et al., 2008*). Ceci suggère

d'ailleurs que la tyrosine 182 semble avoir plus précisément un rôle dans l'auto-activation de p38 et dans la reconnaissance des substrats tandis que la thréonine serait associée à l'activité catalytique. Chez les mammifères, les sérines/thréonines phosphatases (famille des PP2), les tyrosines phosphatases (STEP, HeSTP ou PTP-SL) ou les thréonines/tyrosines phosphatases (DUSPs) sont principalement impliquées dans ce processus. Là encore, tout dépend du signal perçu.

En réponse aux rayonnements ultraviolets, Wip1 (Wild-type p53-induced phosphatase 1), appartenant à la famille des PP2C (Protein Phosphatase type 2C), inhibe directement p38α, ce qui a pour conséquence le blocage de la voie p38α/p53 et donc de l'apoptose induite par les UVs permettant ainsi d'initier la phase de réparation des cellules endommagées (*Takekawa et al., 2000*). En plus de son interaction directe avec p38, PP2A est également capable d'agir sur les MAP2Ks, MMK6 et MKK4 (aussi appelé SEK1), les empêchant ainsi de phosphoryler p38 en retour (**Figure 18**) (*Takekawa et al., 1998*).

La famille des DUSPs (Dual-Specificity Phosphatases), dont font partie les MKPs (MAPK Phosphatases), est capable de déphosphoryler les deux sites de la boucle activatrice, la thréonine et la tyrosine, de p38. Par exemple, une étude a récemment mis en évidence un lien entre stress oxydant, DUSP4 et p38 dans les maladies cardiovasculaires. Le stress oxydant induit lors de l'infarctus du myocarde entraine la dégradation de DUSP4 et la suractivation de p38. En revanche, si les cellules sont traitées par un anti-oxydant, comme le NAC, DUSP4 est restauré et module l'activité de p38 empêchant la mort cellulaire et maintenant l'homéostasie du tissu cardiaque (**Figure 18**) (*Barajas-Espinosa et al., 2014, 2015*).

De plus, depuis plusieurs années maintenant, le rôle des miRNAs dans la signalisation p38 est de plus en plus décrit. Parmi eux, miR-20a, a été décrit en tant que répresseur de p38, dans le cas de l'angiogenèse et la migration des cellules endothéliales induites par le VEGF, en ciblant directement l'ARNm de MKK3 (*Pin et al., 2012*) (**Figure 18**).

Les composés chimiques sont également des outils utiles pour investiguer le rôle de p38. Originellement, p38α a été décrite comme une cible des imidazole pyridines tels que SB203580 ou SB202190 qui sont des composés chimiques s'intercalant dans la boucle activatrice et bloquant la poche ATP et par conséquent l'activité catalytique de la protéine (*Lee et al., 1994*). Cependant, toutes les isoformes n'ont pas la même sensibilité à ces inhibiteurs pour lesquels p38γ et p38δ ne répondent pas, contrairement à p38β (*Kumar et al., 1997*). En effet, les isoformes p38γ et p38δ possèdent un acide aminé différent dans la poche ATP par rapport à p38α et p38β, ne permettant pas l'interaction avec l'inhibiteur (**Figure 18**) (*Cuenda and Rousseau, 2007*). Les effets moléculaires observés suite à l'utilisation des inhibiteurs tels que le SB203580 pourraient être la conséquence d'une inhibition de p38α, mais aussi de p38β bien que son expression soit minoritaire dans l'ensemble des tissus, nécessitant alors l'utilisation de modèles expérimentaux complémentaires.

Cet aperçu sur l'inhibition de p38 nous laisse entrevoir l'étendue de la complexité dépendant du signal perçu et du type cellulaire considéré.

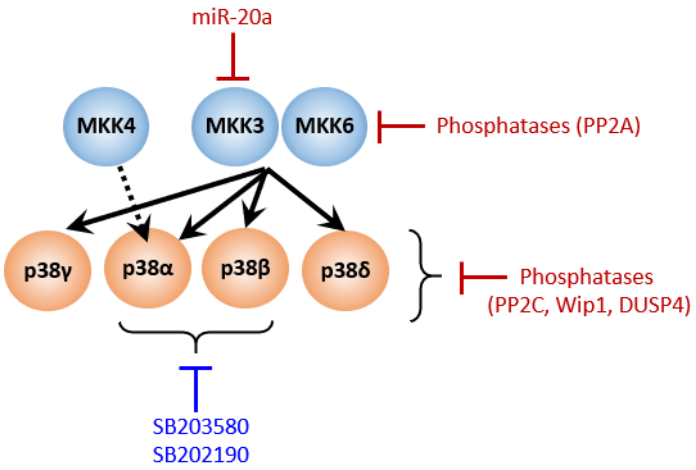


Figure 18. Représentation schématique des mécanismes de phosphorylation de p38.
Directement, p38 peut être déphosphorylée par des phosphatases. Indirectement, les miR et les phosphatases peuvent agir sur les MAP2Ks, empêchant ainsi le maintien de la phosphorylation de p38. Seules les isoformes α et β ont une sensibilité aux inhibiteurs chimiques (en bleu) bloquant la poche ATP de p38.

1.2.4. Localisation cellulaire de p38

En plus d'être réceptive à une multitude de signaux et d'être régulée par différents mécanismes, p38 possède aussi la singularité de pouvoir médier son action dans plusieurs compartiments cellulaires. Ainsi, la phosphorylation de p38 sur son motif TGY induit une réorganisation conformationnelle et stabilise la boucle d'activation en configuration ouverte facilitant alors sa liaison avec les substrats. Ces derniers peuvent être localisés aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau. En conformation non phosphorylée inactive, dans des cellules quiescentes, p38 est principalement cytoplasmique. La structure de p38 ne contenant pas de séquence d'importation nucléaire (NLS), une translocation nucléaire via des partenaires moléculaires est nécessaire pour que p38 puisse agir dans le noyau une fois activée. Ce mécanisme est cependant peu décrit et il semblerait que la translocation nucléaire soit surtout induite en réponse à un stress environnemental. En effet, les quelques travaux existants sur des cellules en condition de stress ont montré qu'il est dépendant des microtubules et de la dynéine (*Gong et al., 2010*). Le modèle proposé suggère une protéine possédant une séquence NLS (non caractérisée pour le moment) qui se lierait à p38 phosphorylée pour la transporter via la dynéine le long des microtubules, du cytoplasme vers le noyau (**Figure 19A**). Après des dommages à l'ADN induits par les UVs, p38 est également transportée vers le noyau suite à un changement conformationnel induit par la phosphorylation du site actif (*Wood et al., 2009*). Ceci permet alors de favoriser la réparation de l'ADN en activant les substrats induits lors du point de contrôle en G2/M du cycle

cellulaire. En revanche, l'implication de la protéine MK2 (MAPKAP Kinase 2) dans l'export de p38 du noyau vers le cytoplasme a maintenant été décrite depuis de nombreuses années dans un contexte de stimulation par l'arsénite (*Ben-Levy et al., 1998*). MK2 est un partenaire de p38 dans le noyau, la phosphorylation de MK2 masque sa séquence NLS lui permettant alors de quitter le compartiment nucléaire. Une donnée récente indique que p38 doit être déphosphorylée avant d'être exportée (**Figure 19B**) (*Gong et al., 2010*). Le retour de p38 dans le compartiment cytoplasmique permet l'activation des substrats, comme les protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette, nécessaires à la réponse induite par les signaux extracellulaires perçus. Par exemple, p38 est activée dans des cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical (HUVECs) stimulées par le LPS (lipopolysaccharide), induisant la phosphorylation des protéines MAP4 (Microtubule-Associated Protein 4) et par conséquent la dissociation des microtubules, perturbant le fonctionnement de la barrière vasculaire (*Zhou et al., 2015*).

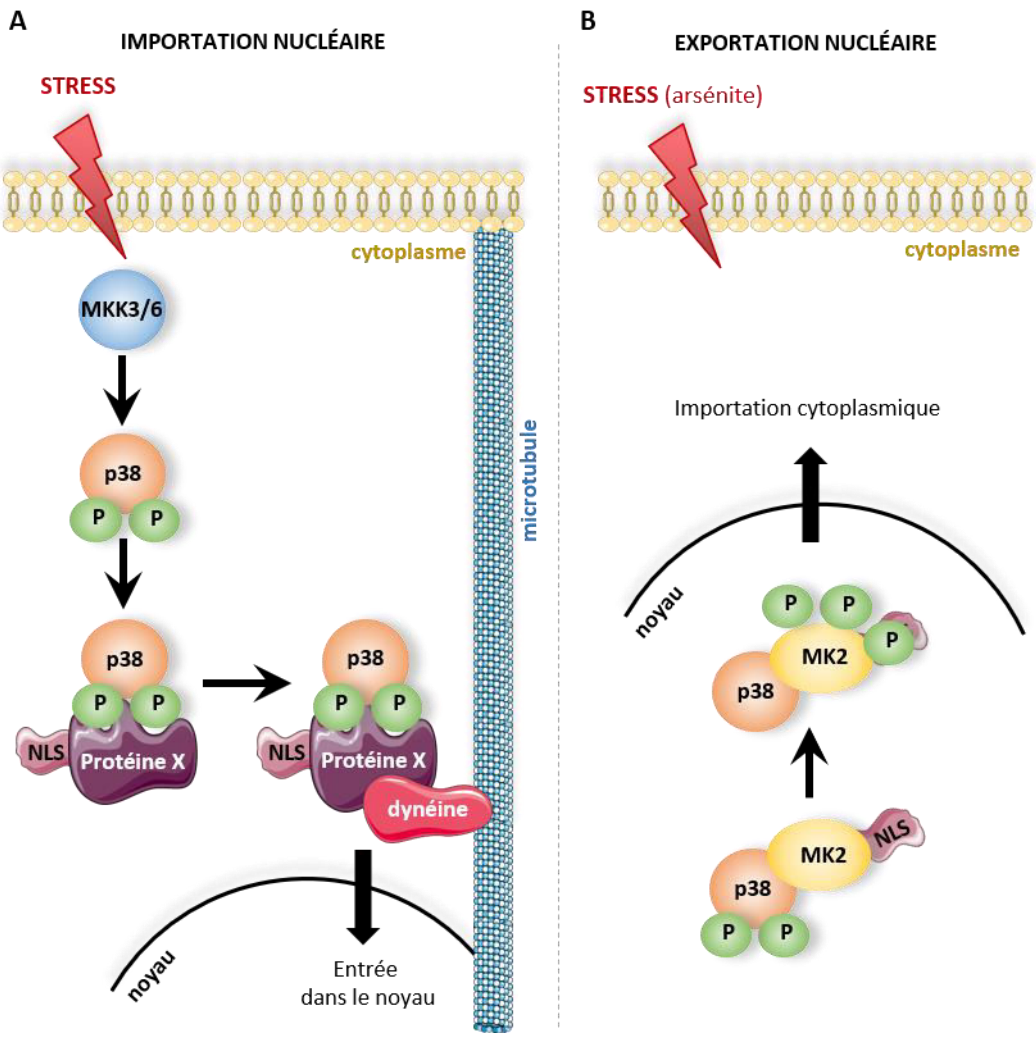


Figure 19. Modèles d'import/export nucléaire de p38.

A. Translocation nucléaire. En réponse à un stress, MKK3/6 active p38 qui interagit avec une protéine contenant une séquence NLS. A l'aide de la dynéine, ce complexe peut ensuite être transloqué vers le noyau le long des microtubules. (Adaptée de *Gong et al., 2010*)

B. Exportation nucléaire. Après stimulation, p38 est déphosphorylée tandis que son partenaire MK2 est phosphorylé. Cette dernière induit un changement de conformation et le masquage de la séquence NLS de MK2. Le complexe p38-MK2 est ainsi relocalisé dans le compartiment cytoplasmique. (Adaptée de *Ben-Levy et al., 1998*)

1.2.5. Les substrats

Le nombre de substrats de p38 est estimé à environ 300, et appartiennent à diverses catégories (*Trempolec et al., 2013*). Ce sont aussi bien des facteurs de transcription, des facteurs remodelant la chromatine, des protéines kinases, des protéines chaperonnes ou encore des phosphatases. Par ailleurs, certains substrats sont phosphorylés de manière plus efficace par une isoforme plutôt qu'une autre, comme MK2 et MK3 par les isoformes p38α et p38β (*Cuenda and Rousseau, 2007*). D'autre part, certaines isoformes ont des cibles préférentielles. C'est notamment le cas de l'isoforme p38γ caractérisée par une séquence C-terminale courte permettant la liaison des protéines avec un domaine

PDZ. Par exemple, l'isoforme p38γ est un régulateur critique de l'engagement des cellules satellites dans la régénération musculaire, via la phosphorylation de la protéine Carm1 (arginine N-methyltransferase 4) (*Chang et al., 2018*).

Dans ce contexte, il conviendra de la difficulté de citer tous les substrats de la famille p38. Certains ont cependant été choisis pour leur pertinence par rapport à l'étude menée lors de cette thèse, en particulier la fonction de p38 dans le cycle cellulaire assez bien décrite dans un grand nombre de types cellulaires mais moins dans les hépatocytes (*cf. §2.1.*) (**Figure 16**, effecteurs en jaune).

1.2.5.1. Activation et reconnaissance des substrats

Même si les MAPKs ont un rôle majeur de sérine/thréonine kinase, il est intéressant de souligner que leur capacité à phosphoryler leurs substrats peut également être influencée par la présence de sites de liaison appelés sites D (pour « docking site » ou « site d'accostage »), différents des sites de phosphorylation (*Tanoue et al., 2000*). L'accostage peut être régulé par phosphorylation dans le domaine D du substrat ou bien via l'interaction avec p38 (*Mayor et al., 2007*). Les interactions avec les domaines D permettraient alors un changement de conformation et l'exposition de la boucle d'activation. Ainsi, l'efficacité et la spécificité des cibles des MAPKs seraient augmentées, induisant une régulation fine de l'intensité et la durée de la signalisation MAPK (*Tokunaga et al., 2014*). L'interaction avec les domaines D est essentielle pour comprendre la dynamique d'assemblage des différents acteurs moléculaires de la voie de signalisation des MAPKs (*Bardwell et al., 2009; Tanoue et al., 2000*). Enfin, même si ce mécanisme reste assez limité, l'action de p38 sur ses substrats ne passe pas obligatoirement par une phosphorylation de ces derniers. En effet, quelques travaux suggèrent une activation par p38 indépendante de son activité kinase où seule l'interaction de p38 et de son substrat serait suffisante pour médier son action. Par exemple, suite à stress ischémique dans le cerveau induit par une privation de glucose, p38α se trouve activée et interagit directement avec la protéine OGT (enzyme catalysant le processus de O-N-Acétylglucosaminylation, O-GlcNac) lui permettant ainsi d'être recrutée sur des cibles cellulaires telles que le neurofilament H, favorisant ainsi une modification post-traductionnelle de ce dernier (*Cheung and Hart, 2008*).

1.2.5.2. Exemples de substrats de p38 et fonctions cellulaires associées

(1) Les facteurs de transcription. Dans le compartiment nucléaire, p38 phosphoryle directement plusieurs facteurs de transcription. Cette phosphorylation peut être activatrice comme pour ATF2 (Activating Transcription Factor 2), CHOP (CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein) ou p53, leur conférant une activité transcriptionnelle de gènes impliqués dans divers processus, respectivement dans le stress cellulaire, la différentiation ou encore le cycle cellulaire (*Ouwens et al., 2002; Pedraza-Alva et al., 2006; Wang and Ron, 1996*). La phosphorylation par p38 peut également

être répressive, comme dans le cas de MRF2 induisant une régulation négative de l'expression de gènes spécifiques du muscle permettant ainsi la différentiation terminale musculaire (*Suelves et al., 2004*). p38 est un important régulateur de certaines sous-unités du complexe SWI/SNF, remodeleur de la chromatine, recruté lors de la différentiation des myoblastes (*Simone et al., 2004*). En réponse à des dommages de l'ADN induits par les UVs, p38α phosphoryle la protéine p18^{Hamlet} entrainant la transcription de gènes dépendante de p53, tels que *Noxa*, et ainsi une réponse pro-apoptotique (*Lafarga et al., 2007*).

(2) Le cycle cellulaire. En plus de ses rôles dans la régulation des processus apoptotiques, de nombreux travaux ont permis de faire émerger l'importance de p38 dans le contrôle du cycle cellulaire, et notamment dans les points de contrôle G1/S et G2/M (*Thornton and Rincon, 2009*). Après une irradiation par les UVs ou les rayons γ, un stress oxydant ou un choc osmotique, induisant par exemple des cassures de l'ADN, p38 est activée ayant pour conséquence un arrêt en phase G2 du cycle cellulaire et empêchant la progression vers la mitose (*Bulavin et al., 2001, 2002*). Divers acteurs moléculaires sont impliqués dans ce point de contrôle (**Figure 20A**). En amont de p38, des travaux ont notamment reporté l'activation d'ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related), senseurs des dommages de l'ADN. ATM est capable d'activer les kinases Tao (Thousand And One amino acid) dont les substrats sont MKK3 et 6 (*Raman et al., 2007*). Plus récemment, Warmerdam et collaborateurs ont mis en évidence que l'arrêt en phase G2 des cellules soumises à des rayonnements UVs est médié par l'activation parallèle de deux voies, p38/MK2 et ATR/Chk1 (Checkpoint Kinase 1) (*Warmerdam et al., 2013*). En aval de p38, la transition G2/M, permise par l'activation d'un complexe essentiel constitué de Cdc2 (appelée aussi Cdk1 pour Cyclin-dependent kinase 1) et de la cycline B, semble contrôlée par deux voies : l'une dépendante de p53 et l'autre via MK2. p53 est une cible directe de p38, sa phosphorylation entraine la dissociation du complexe qu'elle forme avec Mdm2 et ainsi sa stabilisation, permettant alors la transcription de Gadd45α (Growth Arrest and DNA Damage 45), p21 et 14-3-3 (*Hermeking et al., 1997; Taylor and Stark, 2001; Wang et al., 1999*). Ces protéines inactivent le point de contrôle G2/M en inhibant le complexe Cdc2/cycline B. Par ailleurs, p38 peut également agir sur ce point de contrôle à travers l'activation de MK2 qui inhibe la phosphatase Cdc25B, ayant normalement pour rôle de déphosphoryler Cdc2 afin d'activer le complexe Cdc2/Cycline B et permettre la progression dans le cycle cellulaire (*Lemaire et al., 2006*).
L'activation de p38 contribue également à l'induction du point de contrôle G1/S, caractérisé par l'activation des complexes Cdk4 ou 6/cycline D et Cdk2/cycline E, à la suite de stimuli tels qu'un choc osmotique, un stress oxydant ou encore la sénescence. Dans ce contexte aussi, la signalisation induite par p38 peut être dépendante de p53 ou impliquer d'autres intermédiaires (**Figure 20B**). p53 contrôle notamment la progression de la phase G1 vers la phase S via sa cible p21 dont l'accumulation inactive

la Cdk2 (*Kim et al., 2002; Kishi et al., 2001*). Il est intéressant de noter que p38 active également la transcription de p19ARF dont le substrat est p53 (*Bulavin et al., 2004*). De plus, p38 agit sur le point de contrôle G1/S en régulant l'activation des Cdks par l'intermédiaire de Cdc25A, dégradée à la suite de sa phosphorylation par p38 mais qui est aussi inhibée transcriptionnellement par p53, ne pouvant donc plus activer les Cdks 2, 4 et 6 (*Goloudina et al., 2003; Rother et al., 2007*). En complément, l'équipe de Manenti a montré *in vitro* l'existence d'une boucle de rétrocontrôle négative du complexe Cdk4/6/cycline D sur Cdc25A augmentant la stabilité de cette dernière et permettant la transition de la phase G1 vers la phase S (*Dozier et al., 2017*). p38 active la transcription de 16INK4a qui a la capacité d'inhiber les Cdks 4 et 6, et donc le point de contrôle G1/S (*Bulavin et al., 2004*). De plus, p38 régule les niveaux d'expression de la cycline D, directement en la phosphorylant ce qui entraine son ubiquitinylation et sa dégradation au protéasome, ou indirectement via l'activation de HBP1 (HMG box-containing Protein 1) qui inhibe la transcription du gène de la cycline D1 (*Casanovas et al., 2000; Lavoie et al., 1996; Yee et al., 2004*).

Fait intéressant, p38 a également été décrit en tant que point de contrôle du cycle cellulaire des cellules pathologiquement polyploïdes, évitant ainsi toute prolifération incontrôlée, l'émergence d'une aneuploïdie cellulaire mais aussi l'installation d'une instabilité génomique (*Davoli and de Lange, 2011*). En effet, les cellules tétraploïdes nouvellement formées subissent un arrêt en G1 du cycle cellulaire de manière dépendante de la voie p38-p53 induisant alors l'apoptose ou la sénescence de ces dernières (*Mikule et al., 2007; Vitale et al., 2008*). Cependant sous certaines conditions, la perte d'intégrité de ces points de contrôle (un contexte mutationnel ou bien une altération des voies de signalisation par exemple) permet à ces cellules polyploïdes de progresser en mitose. Ces cellules peuvent alors être (1) soit bloquées au point de contrôle mitotique nommé SAC (Spindle Assembly Checkpoint ayant lieu à la transition entre la métaphase et l'anaphase) et sortir de mitose (genèse de cellules polyploïdes, maintien de l'intégrité génomique) ou bien (2) progresser jusqu'en anaphase avec la présence de figures mitotiques aberrantes (« chromosomes trainants » par exemple) conduisant à la genèse de cellules génétiquement instables (aneuploïdes). Une altération de ce SAC a été retrouvée dans de nombreux cancers chez l'homme, entrant alors la genèse de cellules aneuploïdes (*Davoli and de Lange, 2011*). Une meilleure compréhension de la signalisation p38/p53, de par sa capacité mutationnelle élevée, devrait permettre d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses (*Stramucci et al., 2018*).

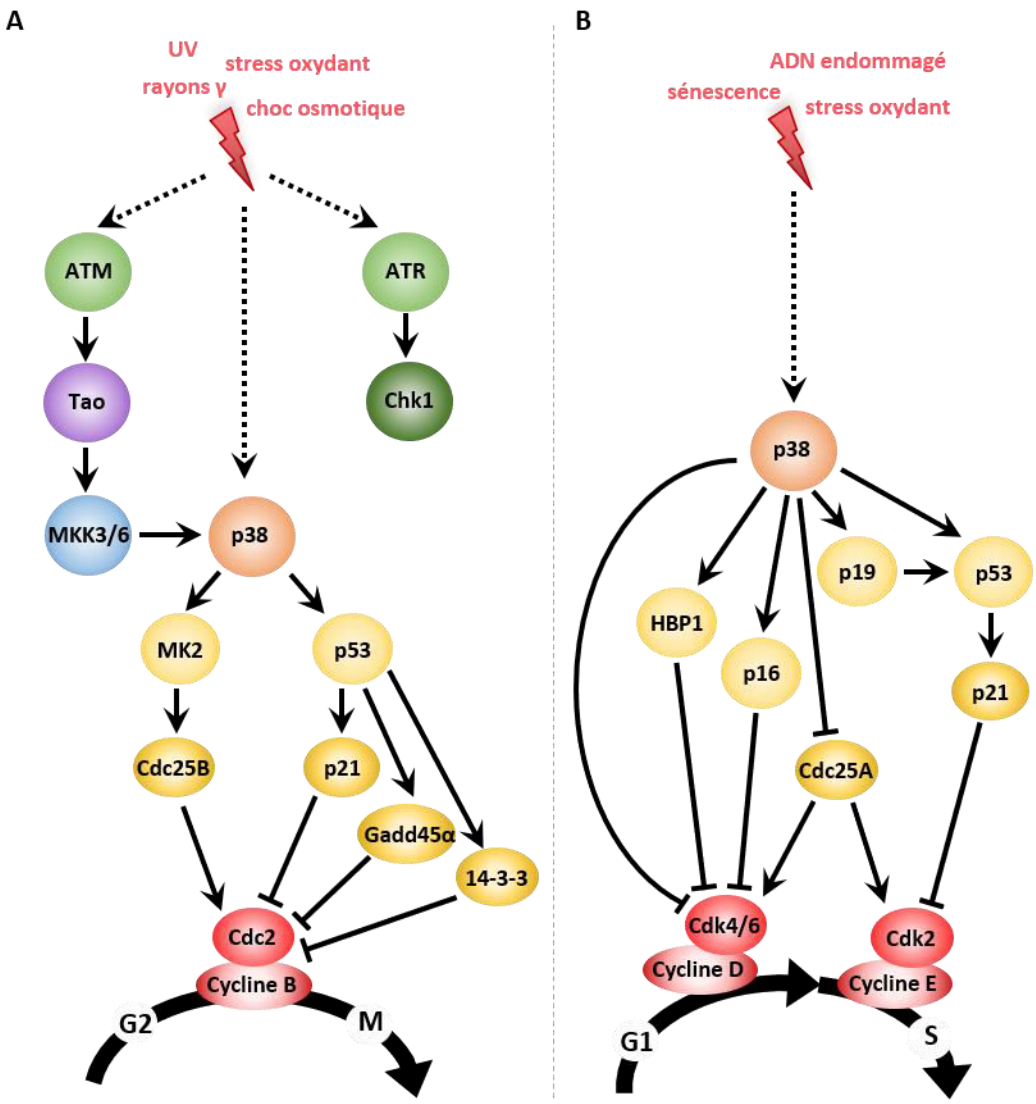


Figure 20. Représentation schématique du rôle de p38 sur les points de contrôle G2/M et G1/S.
A. Point de contrôle G2/M. p38 régule la transition de la phase G2 vers la mitose en agissant sur le complexe Cdc2/cycline B.
B. Point de contrôle G1/S. p38 régule la transition de la phase G1 vers la phase S en agissant sur les complexes Cdk4/6/cycline D et Cdk2/cycline E.
(Adaptée de *Thornton and Rincon, 2009*)

(3) La dégradation protéosomale. Dans le cytoplasme, p38 régule notamment le renouvellement des protéines en agissant sur la dégradation médiée par le protéasome ou les lysosomes. L'infection bactérienne de macrophages murins par *M. tuberculosis*, produisant des radicaux libres, induit la phosphorylation des protéines FLIPs (FLICE-like inhibitory protein) par p38, facilitant leur interaction avec l'ubiquitine ligase E3, les adressant ensuite au protéasome pour être dégradés (*Kundu et al., 2009*). Une étude sur les fibroblastes a montré que p38 est adressée vers les autophagosomes à la suite de son activation spécifique par le complexe Gadd45-MEKK4. Au niveau de la membrane de l'autophagosome, p38 activée phosphoryle Atg5 inhibant ainsi la voie de l'autophagie (*Keil et al.,*

2013). La métalloprotéase ADAM17 (A Disintegrin and Metalloprotease) est également une cible de p38. En effet, en réponse à des signaux inflammatoires, p38 phosphoryle ADAM17 sur son domaine cytoplasmique ce qui a pour conséquence le relargage de cytokines telles que le TGFα qui active la voie de signalisation du récepteur de l'EGF et donc la prolifération cellulaire (*Xu and Derynck, 2010*).

(4) Les Mitogen- and Stress-activated kinases, MSKs. Enfin, les protéines kinases, directement activées par p38, peuvent être des intermédiaires dans la mise en place de la réponse finale. Par exemple, les MSKs 1 et 2, qui sont des sérine/thréonine kinases nucléaires, phosphorylent directement les facteurs de transcription, CREB ou encore la sous-unité p65 de NF-κB (*Deak et al., 1998; Vermeulen et al., 2003*). Les MSKs ont également été associées à un rôle dans l'immunité innée en régulant la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et le fonctionnement neuronal (*Reyskens and Arthur, 2016*). Alors que PRAK (p38-Regulated/Activated Kinase) est maintenant connue depuis de nombreuses années, en tant que kinase prédominante induite en réponse au stress et surtout en tant qu'activateur d'Hsp27 (Heat Shock Protein 27, impliquée dans la polymérisation des filaments d'actine, la réparation des protéines membranaires dénaturées ou encore en inhibant le cytochrome c lui conférant une activité anti-apoptotique), un rôle dans la migration des cellules endothéliales lors de la tumorigenèse a également été décrit ces dernières années (*New et al., 1998; Yoshizuka et al., 2012*). PRAK et sa cible FAK (Focal Adhesion Kinase), indépendamment de la voie Hsp27, sont activés par p38 en réponse à des facteurs proangiogéniques sécrétés par l'environnement tumoral induisant alors une réorganisation du cytosquelette et favorisant la motilité des cellules endothéliales, ainsi que l'angiogenèse tumorale.

Seulement quelques exemples, les plus classiques, ont été présentés mais cela montre déjà le rôle pléiotropique de p38 et la complexité des voies de signalisation impliquées. Par ailleurs, nous avons pu remarquer que la réponse induite par un stimulus donné est dépendante des activateurs préférentiels et des substrats mis en jeu, mais aussi du type cellulaire considéré dont il faut également tenir compte.

2. Fonctions hépatiques de p38

Le foie contient de nombreux types cellulaires conférant alors à p38 des rôles variés. Par ailleurs, il est important de souligner que la fonction de l'isoforme p38α est la mieux caractérisée, étant ubiquitaire et majoritaire dans les cellules hépatiques, et possédant un inhibiteur efficace (le SB203580). Cependant, les isoformes p38γ et p38δ tendent maintenant à être mieux connues, notamment de par leur présence au sein des cellules immunitaires.

Les fonctions hépatiques présentées dans la suite de ce chapitre ne sont pas exhaustives mais en donnent déjà un aperçu non négligeable (**Figure 21**).

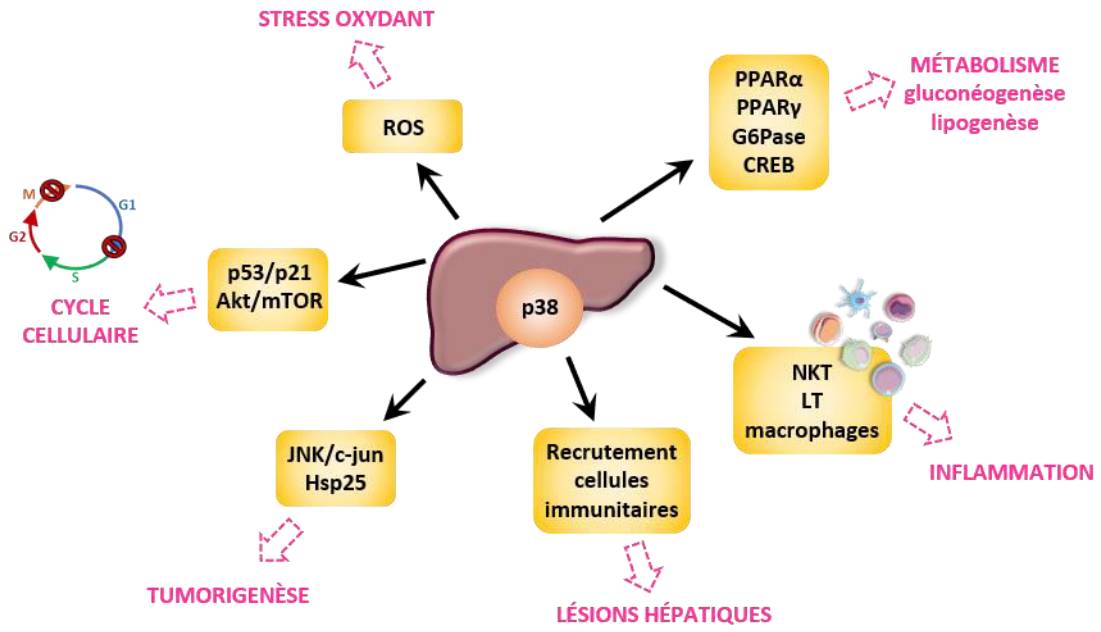


Figure 21. Exemples de fonctions hépatiques de p38.
De par son rôle de MAPK, p38 dans le foie a de nombreuses fonctions comme dans le cycle cellulaire, le stress oxydant, le métabolisme, l'inflammation, dans les agressions aiguës ou la tumorigenèse hépatiques.

2.1. p38 et régulation du cycle cellulaire

Les hépatocytes sont quiescents (en phase G0 du cycle cellulaire) et se divisent peu en conditions normales. Cependant, des changements prolifératifs interviennent à différents stades du développement embryonnaire ou post-natal permettant ainsi l'étude du cycle cellulaire hépatocytaire dans ces contextes spécifiques. L'ensemble des données de la littérature semble plutôt en faveur d'un rôle inhibiteur de p38 sur la prolifération et le cycle cellulaire, rôle médié par sa phosphorylation. Des travaux, réalisés il y a une vingtaine d'années, ont montré une corrélation inverse entre l'activation de p38 et la capacité proliférative des hépatocytes au cours du développement embryonnaire et périnatal chez le rat (*Awad et al., 2000*). En effet, un pic d'activation de p38 (déterminé par la phosphorylation de son substrat ATF2) est observé à E21, puis à P28, persistant à l'âge adulte, ces deux périodes développementales étant corrélées à une activité proliférative quasiment nulle des hépatocytes. *A contrario*, la prolifération est augmentée quand p38 a une faible activité. A l'aide de modèles murins présentant une activation constitutive ou une inactivation de MKK6 (activateur direct de p38), cette équipe a également montré une corrélation inverse entre l'activité de p38 et la quantité de cycline D1, essentielle à la progression en phase G1 du cycle cellulaire. L'inactivation de MKK6 entraine une augmentation de l'immunomarquage contre la cycline D1 alors qu'une activation constitutive de MKK6

la diminue. L'importante diminution de la cycline D1 à E21, puis à P28, renforce l'idée d'un arrêt du cycle cellulaire, médiée en amont par p38 et MKK6. Par ailleurs, les travaux de Wada dans des hépatoblastes où l'expression de p38α est inactivée (inhibition pharmacologique) ont confirmé ces données. En effet, ces cellules qui ont un taux basal de prolifération relativement faible, voit celui-ci très augmenté à la suite de la perte d'activité de p38α (*Wada et al., 2008*). Concernant l'activité de p38 dans un foie normal, plusieurs travaux soulignent le fait que p38 présente une activation constitutive (*Campbell et al., 2011; Liao et al., 2004; Mendelson et al., 1996; Stepniak et al., 2006*). Cependant son niveau d'activité varie selon les études et il semblerait que le mode de préparation des tissus hépatiques servant à l'analyse protéique influe grandement sur la phosphorylation de p38.

L'effet de p38 sur le cycle cellulaire hépatocytaire a été reporté dans un deuxième système, celui de la régénération induite par une hépatectomie partielle (HP) (*Campbell et al., 2011*). Alors que dans le foie adulte quiescent, l'équipe de Campbell constate l'activation constitutive de p38, cette dernière est rapidement déphosphorylée par la phosphatase DUSP1 dans les trente premières minutes suivant une HP. A partir de 12 heures après l'HP, p38 se retrouve de nouveau déphosphorylée, tout comme son activateur MKK6. Fait intéressant, cette cinétique d'activation de p38 est inversement corrélée à l'expression de Akt et de p70S6K impliquées notamment dans la synthèse des protéines. Cette inactivation transitoire de p38 permettrait alors aux hépatocytes d'initier leur cycle cellulaire et d'effectuer la transition G1/S. La mise en évidence d'une suractivation de p38 dans des hépatocytes primaires délétés de la kinase JNK1, a permis de souligner l'interaction forte entre les voies p38 et JNK (interaction déjà décrite dans d'autres types cellulaires), laissant donc présager d'un rôle clé de cette dernière dans la régulation de la prolifération hépatocytaire (*Eferl et al., 2003*). Ce sont notamment les travaux de l'équipe de Wagner qui ont permis de mieux comprendre comment p38α régulait la prolifération hépatocytaire après l'HP, et surtout de mettre en lumière ses liens étroits et complexes avec la voie JNK/c-jun (*Stepniak et al., 2006*). En effet, dans un modèle murin présentant une invalidation-spécifique de c-jun (cible de la kinase JNK, facteur de transcription régulant la prolifération cellulaire au cours de la PH) dans le foie, l'équipe de Wagner a alors observé une augmentation anormale de p38 phosphorylée et de p21 au cours du processus de régénération hépatique après HP, entrainant un arrêt du cycle cellulaire en transition G1/S (*Schwabe et al., 2003; Stepniak et al., 2006*). Par ailleurs, les double KO c-jun/p53 ou c-jun/p21, quant à eux, montrent une diminution de phospho-p38 et un sauvetage du phénotype prolifératif. Enfin, l'expression de p21 est atténuée dans le double KO c-jun/p38α et est associée à une prolifération comparable aux souris contrôles. Ces données ont permis de proposer que, lors de la régénération, les activités de p53 et de la MAPK p38 sont inhibées par c-Jun, empêchant ainsi l'accumulation de la protéine p21, favorisant alors l'engagement des hépatocytes en phase G1 du cycle cellulaire.

Quand bien même dans d'autres systèmes cellulaires un rôle de p38α a été décrit dans la régulation des phases tardives du cycle cellulaire, notamment lors de la mitose, la question reste ouverte dans le foie (*Thornton and Rincon, 2009*). Les travaux de Tormos ont cependant montré un rôle de cette protéine lors du vieillissement (*Tormos et al., 2017*). En effet, l'invalidation de p38α dès l'état embryonnaire (modèle murin Alf-Cre-p38α$^{-/-}$) entraine une augmentation du nombre d'hépatocytes binucléés dans les foies de souris âgées (entre 18 et 24 mois). L'étude de ce modèle murin montre une augmentation de l'expression de la Cycline B1 mais aussi un défaut majeur dans l'assemblage du cytosquelette d'actine (entrainé par une diminution de l'expression de RhoA et Cdc42) suggérant le bon déroulement de la phase S mais un échec de la cytodiérèse. p38α serait donc essentielle pour la dynamique de l'actine et par conséquent influerait sur l'intégrité des divisions cellulaires lors du vieillissement. Cette fonction de p38α a aussi été décrite dans un autre contexte, mais pathologique cette fois-ci (*Tormos et al., 2013a*). Lors d'une inflammation chronique induite pendant une cholestase, l'absence de p38α dans les hépatocytes entraine une réduction de la taille cellulaire via la voie de signalisation Akt/mTOR et un blocage en mitose, favorisant la genèse des hépatocytes binucléés.
L'ensemble de ces données nous montre donc que, dans le foie, p38 joue un rôle important de point de contrôle du cycle cellulaire des hépatocytes lors des processus physiopathologiques.

2.2. p38 et stress oxydant

Depuis de nombreuses années, p38 est connue pour être un important médiateur de la signalisation des espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour Reactive Oxygen Species), dont les effets sur la cellule peuvent être bénéfiques ou délétères selon le contexte (*Barnouin et al., 2002; Kurata, 2000; Martindale and Holbrook, 2002; Wang et al., 2013b*).
Une étude menée en 1996 a d'abord montré que lors d'un stress oxydant métabolique tel que celui induit par le tétrachlorure de carbone (CCl_4), les voies des MAPK JNK et p38 étaient régulées de manière différentielle (*Mendelson et al., 1996*). En effet, alors que la voie JNK/c-jun est activée, p38 est déphosphorylée dans les premières heures suivant le traitement par le CCl_4 par la phosphatase MKP-1. Il semblerait, d'ailleurs que, dans ce cas, cette dernière soit spécifiquement induite par le stress oxydant puisqu'elle est localisée en zone péricentrale, lieu privilégié du métabolisme du CCl_4. Fait intéressant, dans d'autres systèmes cellulaires, une activation de la voie JNK conduit à une induction de cette phosphatase MKP-1 ; dans le foie soumis à un stress oxydatif, la forte activation de JNK pourrait donc favoriser l'activation de MKP-1 et par conséquent l'inhibition de l'activité de p38 (*Bokemeyer et al., 1998; Liu et al., 1995*). La régulation opposée de ces deux voies majeures pourrait ainsi permettre un contrôle plus fin des réponses apoptotique et prolifératives nécessaires pour le retour à l'homéostasie hépatique suite à ce stress oxydatif. Une différence selon « l'âge » des hépatocytes dans la réponse au stress oxydant a également été mise en évidence (*Li and Holbrook,*

2003). Le traitement par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) d'hépatocytes primaires humains n'entraine pas de changement significatif de l'expression de JNK. En revanche, la phosphorylation de p38 augmente aussi bien dans les hépatocytes de souris jeunes (4 à 5 mois) qu'âgées (24 à 29 mois), mais avec une amplitude plus importante chez ces dernières. De surcroit, l'activation de p38 est durée et dose-dépendante. Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de p38 dans les hépatocytes ayant subi un stress oxydant fort (forte concentration d'H2O2), n'induit aucun changement dans les hépatocytes jeunes, seulement dans les hépatocytes âgés, avec une diminution de leur mort cellulaire. Ces données indiquent donc que p38 contribue à la faible résistance au stress oxydant des hépatocytes âgés. Ce même traitement sur des hépatocytes fœtaux humains immortalisés (cellules L-02) a permis de démontrer le rôle de certains miRs, parmi lesquels le miR-200a-3p est associé à p38α (*Xiao et al., 2015*). En effet, le stress oxydant induit par l'H_2O_2 entraine l'expression du miR-200a-3p associée à l'inhibition de la voie p38α/Akt-GSK3β/p53 conduisant à la mort cellulaire. En revanche, l'acide palmitique (AP) sur des cellules hépatiques humaines normales (QZG) stimule leur prolifération (*Wang et al., 2011*). Le mécanisme sous-jacent implique la voie p38-ERK/Akt activée par la production de ROS, puis Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) associé à l'effet pro-prolifératif de l'AP. Enfin, même si p38 est un important médiateur de la signalisation des ROS, dans certaines conditions elle peut aussi agir en amont de cette dernière. Ainsi, les travaux de Perez, ont permis de montrer que p38α est impliquée dans la régulation des défenses anti-oxydantes dans le foie adulte et ceci via l'activation de la voie NF-κB (*Pérez et al., 2018*).

2.3. p38 et métabolisme

Comme évoqué précédemment, le foie joue un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie glucidique et lipidique et de nombreuses études ont permis de montrer une nouvelle facette de p38α dans la régulation de ces processus.

Bien que différents travaux utilisant soit des modèles de culture d'hépatocytes primaires associés à l'usage d'un inhibiteur non spécifique de p38α (car inhibant aussi l'isoforme p38β, minoritaire dans le foie), soit des modèles murins pathologiques, aient suggéré une participation active de p38α dans la gluconéogenèse hépatique en stimulant l'expression des enzymes clés telles que la PEPCK (Phosphoénolpyruvate carboxykinase) et la G6Pase (Glucose-6-Phosphatase), ce sont les travaux de l'équipe de Jing qui ont mis à jour les mécanismes sous-jacents à la régulation de l'homéostasie du glucose (*Collins et al., 2006; Jing et al., 2015; Lee et al., 2011*). En effet, Jing et collaborateurs ont mis en évidence une corrélation inverse entre la phosphorylation de p38α et celle de l'AMPKα, protéine kinase régulant l'homéostasie énergétique en activant les voies cataboliques productrices d'énergie (oxydation des acides gras) et inhibant les voies métaboliques qui en consomment (néoglucogenèse et lipogenèse). Lorsque p38α est invalidée dans un foie murin (modèle Alb-Cre- p38$\alpha^{lox/lox}$), l'AMPKα est

activée, entrainant une altération de la gluconéogenèse associée à une hypoglycémie à jeun. TAK1 semble être au cœur de ce mécanisme. Effectivement, cette MAP3K est un activateur en amont de p38α mais aussi de l'AMPKα, et il existe une boucle de rétrocontrôle de p38α sur TAK1. L'inactivation de p38α entraine alors une augmentation de l'expression de TAK1, qui influe sur la phosphorylation de l'AMPKα, et par conséquent sur la gluconéogenèse. Cette signalisation est aussi observée après une réponse au stress. Dans un premier temps, le jeûne précoce induit la sécrétion de glucagon permettant le maintien de la glycémie à un taux normal via l'activation en pic de p38α et l'inhibition de l'AMPKα. Par contre, chez les sujets diabétiques (modèles murins *db/db*, *ob/ob* ou recevant un régime supplémenté en gras, HFD), l'activation chronique de p38α (condition de fort stress oxydant) entraine l'inhibition de l'AMPKα, mais a pour conséquence une activation constitutive de la gluconéogenèse (**Figure 22**).

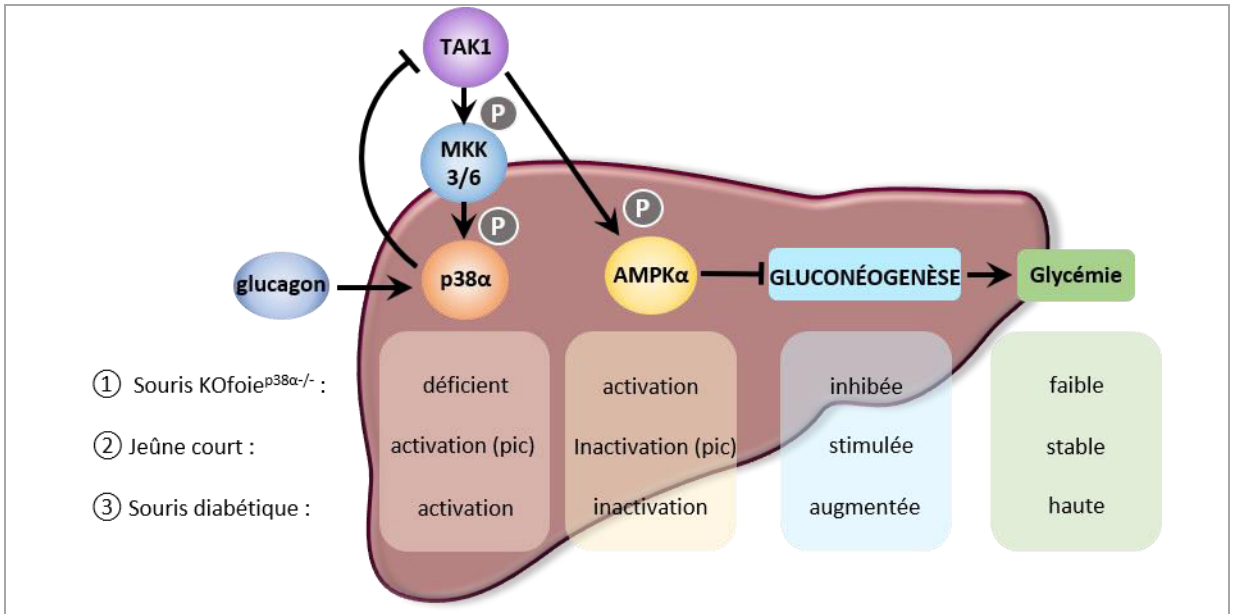


Figure 22. Représentation schématique de la MAPK p38α dans la gluconéogenèse en conditions physiopathologiques.

1. p38α a la capacité d'inhiber la signalisation de l'AMPKα via une boucle de rétrocontrôle négative sur TAK1. L'invalidation de p38α induit une suractivation de TAK1 qui phosphoryle l'AMPKα, induisant alors l'inhibition de la gluconéogenèse et la baisse de la glycémie.

2. Pendant la phase de jeûne précoce, l'activation aiguë de p38α par le glucagon inhibe la phosphorylation de l'AMPKα et donc la gluconéogenèse, maintenant la glycémie stable.

3. Chez les sujets diabétiques, l'activation chronique de p38α empêche la phosphorylation de l'AMPKα, la gluconéogenèse est donc constitutivement active.

(Adaptée de *Jing et al., 2015*)

L'utilisation du modèle murin déficient en MKP-1 spécifiquement dans le foie a également permis d'étudier indirectement le rôle de p38. Pour rappel, p38 est désactivée par la phosphatase MKP-1. Cependant, il faut garder en mémoire que cette dernière agit aussi sur la déphosphorylation de JNK

(mais pas de ERK1/2). L'absence de MKP-1, entrainant donc l'activation de p38, est associée à l'augmentation de l'expression des gènes *G6pc*, *Pck1* et *Pgc-1* et de la phosphorylation de CREB (C-AMP Response Element-binding protein) (*Lawan et al., 2015*). MKP-1 est donc un régulateur négatif majeur de la gluconéogenèse, probablement via la voie de signalisation p38. De plus, il semble que MKP-1 contrôle la lipogenèse hépatique. Effectivement, MKP-1 est phosphorylée chez des souris obèses ayant reçu un régime HFD comparées aux souris normales. De façon complémentaire, les souris sous régime HFD déficiente pour MKP-1 ne développent pas de stéatose hépatique et présentent une augmentation de l'expression de *Ppar-α* (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) participant à l'oxydation des acides gras. Les facteurs *Ppar-γ* (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) et *Srebp-1c* (Sterol regulatory element-binding protein) impliqués dans la lipogenèse sont, quant à eux, diminués (**Figure 23**). Le rôle inhibiteur de p38 dans la lipogenèse, en régulant la transcription des gènes *Srebp* et *Pgc-1*, avait déjà été reporté dans une lignée cellulaire d'hépatomes murine (*Xiong et al., 2007*).

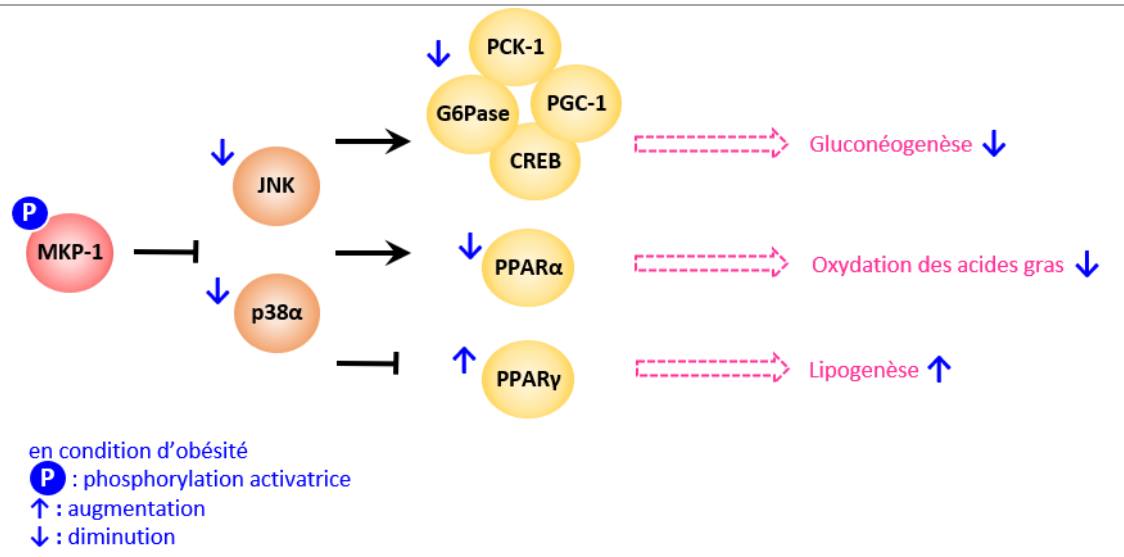


Figure 23. Représentation schématique de la régulation du métabolisme du glucose et des lipides par la phosphatase MKP-1.

En conditions d'obésité, MKP-1 est surexprimé, induisant une diminution de l'activité des MAPK JNK et p38α. La gluconéogenèse et l'oxydation des acides gras sont altérées alors que la lipogenèse est augmentée. (Adaptée de *Lawan et al., 2015*)

D'autre part, p38 est impliquée dans l'homéostasie du glucose en agissant sur le stress du réticulum endoplasmique (RE) (*Lee et al., 2011*). La forme épissée de Xbp1 (X-box binding protein 1), Xbp1s, est la forme active de la protéine dont la fonction est très importante dans la capacité de pliage protéique du RE. De plus, Xbp1s phosphorylée est transloquée au noyau afin de réguler le stress du RE. Chez la souris obèse *ob/ob* insulino-résistante, la diminution de p38 est corrélée à un blocage de la

translocation nucléaire de Xbp1s. La réactivation de p38, à l'aide d'une activation constitutive de MKK6, restaure la translocation nucléaire de Xbp1s, réduit le stress du RE et augmente la sensibilité au glucose et à l'insuline.

Les isoformes p38γ et p38δ semblent également avoir un rôle dans le développement de la stéatose. Des travaux récents ont montré des niveaux élevés de p38γ et p38δ dans une cohorte de patients obèses avec une NAFLD et de patients avec un foie stéatosé (*González-Terán et al., 2016*). Ceci a ensuite été confirmé dans un modèle murin de stéatose (sous régime MCD, Methionin-Cholin-Diet). Cette étude met finalement en évidence l'influence des neutrophiles, exprimant ces deux isoformes γ et δ, sur le développement de la stéatose et les changements métaboliques hépatiques.

2.4. p38 et immunité

À la suite d'une infection par un agent pathogène ou d'une lésion tissulaire, la stimulation des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (ou PPR pour Pattern Recognition Receptor) à la surface et dans le cytoplasme des cellules immunitaires innées active les MAPKs p38. Par exemple, le LPS, ligand du TLR-4 (Toll-like Receptor 4), active p38α permettant la production de TNF-α, d'IL-12 et IL-18 dans les macrophages, par l'intermédiaire de la régulation de C/EBP-β (CCAAT/enhancer-binding protein beta) et l'activation de CREB (*Kang et al., 2008*). Par ailleurs, nous avons vu que p38α pouvait être phosphorylée par TAB1 de manière non-conventionnelle après une stimulation par le TLR des lymphocytes T (*cf §1.2.2.*). p38α est capable en retour d'inhiber TAB1 grâce à une boucle de rétrocontrôle négative permettant ainsi de limiter la signalisation induite par le TLR (*Cheung et al., 2003*). L'invalidation de p38β n'a, en revanche, que peu d'effet sur la production de cytokines induites par le TLR (*Beardmore et al., 2005*). Concernant p38γ et p38δ, elles ont un rôle important dans la transcription de l'IL-1β et l'IL-10 et dans la traduction de l'ARNm de TNF-α lorsque les macrophages sont stimulés par le LPS (*González-Terán et al., 2013; Risco et al., 2012*). Un rôle plus spécifique de p38δ a été décrit dans une étude sur les neutrophiles (*Ittner et al., 2012*). En effet, la délétion de p38δ spécifiquement dans les neutrophiles entrainent un défaut de chimiotactisme et donc de recrutement de ces cellules.

Dans le foie, la fonction de p38 dans les cellules immunitaires est plutôt associée à un contexte pathologique pro-inflammatoire. Les travaux de Nagaleekar et collaborateurs utilisent le modèle d'injection d'α-Galcer stimulant les NKT, permettant alors l'étude de leur activation, mais induisant aussi des dommages hépatiques importants. Ils ont ainsi rapporté que p38α n'est pas nécessaire pour le développement des NKT mais contribue à la synthèse des cytokines que ces cellules sécrètent, dont l'IFN-γ et l'IL-4, via la signalisation Mnk (MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase)/eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E) (*Nagaleekar et al., 2011*). De plus, les dommages tissulaires ne sont pas perceptibles lorsque p38α est inactivée dans les NKT, ce qui est

également confirmé par une très nette réduction de l'expression de la caspase 3 clivée, suggérant un rôle primordial *in vivo* de p38α dans la mise en place des lésions hépatiques induites par les NKT (**Figure 24A**). Le modèle d'injection de concanavaline-A (ConA) entraine une inflammation chronique due à l'activation des lymphocytes T et NKT qui sécrètent du TNF-α et de l'IFN-γ et a pour conséquence la nécrose hépatocytaire. Des modèles murins présentant une délétion cellule-spécifique de p38α (lymphocytes T et NKT, ou hépatocytes) ont été traités par la ConA afin de mieux comprendre le rôle de p38α dans chaque type cellulaire en contexte inflammatoire (*Kang et al., 2015*). L'étude montre que l'absence de p38α dans les lymphocytes T et les NKT a un effet protecteur contre la ConA (diminution des cytokines TNF-α, IL-10 et IFN-γ), contrairement à l'invalidation de p38α dans les hépatocytes (modèle Alb-Cre) qui aggrave les dommages hépatiques. Par ailleurs, dans ce modèle, la sécrétion de cytokines (TNF-α et IFN-γ) et chimiokines (CXCL-9 et 10 par exemple) est augmentée. Ainsi, en conditions pathologiques, il semblerait que p38α dans les hépatocytes régule le recrutement des cellules immunitaires, de par son rôle anti-inflammatoire, alors que dans les lymphocytes T et les NKT, elle conduit à la mise en place d'une réponse inflammatoire (**Figure 24B**). Un troisième modèle a été choisi par l'équipe de Liu pour investiguer le rôle de p38α dans les macrophages (*Liu et al., 2017a*). L'injection de D-galactosamine (GalN) combinée à celle de TNF-α entraine des lésions hépatiques importantes par apoptose massive des hépatocytes. La délétion de p38α dans les macrophages amoindrit les dommages induits par le traitement GalN/TNF-α (diminution de l'apoptose) et accélère la régénération hépatique (augmentation des niveaux d'expression des cyclines D1 et E1, et de la CDK1). Par ailleurs, elle empêche le recrutement des granulocytes et l'infiltration des monocytes dans le foie, la production de cytokines (IL-6 et IFN-γ) et chimiokines (CCL2 et CCL5) étant altérée. De surcroit, la polarisation des macrophages est également affectée. En effet, la polarisation vers le type M1 est inhibée tandis qu'elle est favorisée pour le type M2, ce qui confère un phénotype de préférence réparateur. p38α dans les macrophages régule le chimiotactisme et ainsi le recrutement de cellules immunitaires impliquées lors d'agressions aiguës du foie telles que celles induites par le traitement GalN/TNF-α (**Figure 24C**).

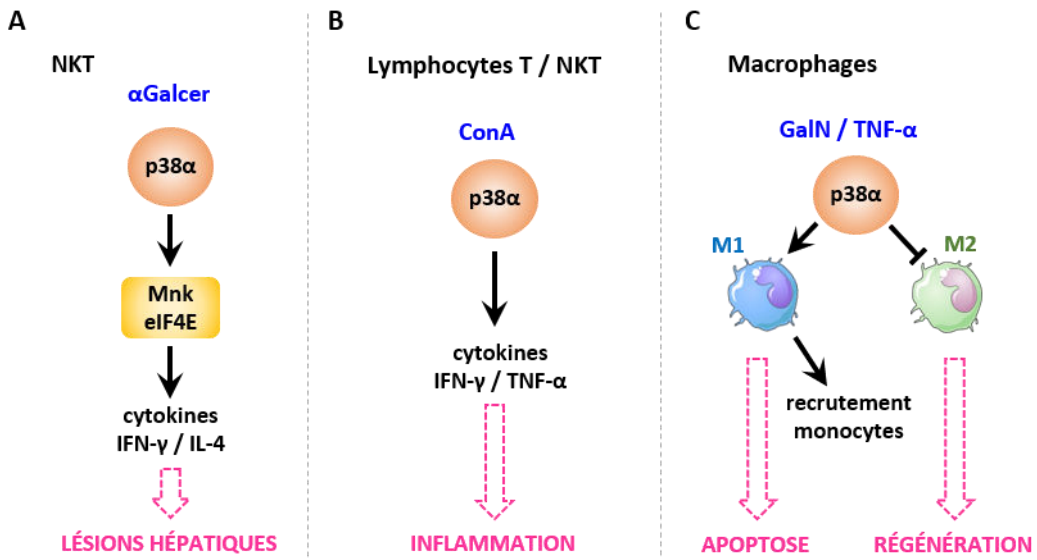


Figure 24. Représentation schématique des rôles de p38α dans les cellules immunitaires hépatiques.

A. Dans les NKT, lors d'une stimulation par l'αGalcer, p38α contribue à la synthèse des cytokines, via la signalisation Mnk/eIF4E.

B. Dans les lymphocytes T et les NKT, à la suite d'une injection de ConA, p38α conduit à une réponse inflammatoire.

C. Après traitement GalN/TNF-α, p38α oriente les macrophages vers un phénotype M1 impliqué dans l'apoptose, et inhibe la polarisation vers le type M2. (Adaptée de *Liu et al., 2017a*)

2.5. p38 et agressions aiguës du foie

De par sa fonction de détoxification, le foie est constamment soumis à des agressions contre lesquelles il doit lutter. Il arrive cependant que l'atteinte soit trop importante mettant à mal les activités hépatiques. Les principaux travaux étudiant le rôle de p38, par invalidation directe cellule-spécifique, dans les agressions aiguës du foie ont été évoquées dans le paragraphe précédent (*cf §2.4.*) et concerne donc surtout les cellules immunitaires. Certains éléments supplémentaires ont néanmoins été reportés lors de l'investigation de la fonction d'activateurs ou de substrats de p38 (**Table 2**). C'est notamment le cas de Nagakawi et collaborateurs qui ont montré l'activation de ASK1 dans le modèle de surdosage d'acétaminophène (APAP, ou paracétamol) (*Nakagawa et al., 2008*). ASK1 étant en amont des voies de signalisation de JNK et de p38, la part de ces dernières dans la réponse à l'APAP ont été analysées à l'aide de modèles murins KO. Ces travaux, comme ceux d'autres équipes ont permis de montrer que les dommages induits par l'APAP sont essentiellement médiés par la voie JNK (*Gunawan et al., 2006; Henderson et al., 2007*). Différemment les auteurs soulignent que p38α ne semble pas participer à l'émergence des lésions hépatiques post-APAP. Cependant, il faut noter que pour cette étude, les auteurs ont utilisé une souris hétérozygote p38α$^{+/-}$. Même si dans le foie de cette souris, l'activité de la protéine p38 semble réduite, il reste quand même un niveau basal d'activation, qui ne permet donc pas d'exclure un rôle de p38 dans la toxicité de l'APAP. Les travaux menés par

Zhang et collaborateurs ne permettent pas non plus de clarifier cette question. Lors de cette étude, MKK4 a été identifiée comme la MAP2K activée lors de l'agression hépatique médiée par l'APAP, puisque son absence (knock-down (KD) par une stratégie Morpholino) est hépatoprotective (*Zhang et al., 2017b*). Cette MAP2K phosphorylant aussi bien JNK que p38, les auteurs ont alors regardé l'effet de la diminution de l'expression et de l'activation de p38 (KD) dans le foie murin sur la réponse hépatique après APAP. Ils n'ont observé aucun changement que ce soit dans le taux d'ALAT (Alanine Amino Transaminases, reflet des dommages hépatiques) ou dans les plages de nécrose en comparaison à un foie contrôle. Seule une augmentation de la phosphorylation de JNK a été observée. Les auteurs ont donc conclu que seule la protéine JNK serait impliquée dans le modèle de surdosage d'APAP. Cependant, la statégie Morpholino présente un biais, car elle ne cible pas spécifiquement les hépatocytes et impacte donc tous les types cellulaires du tissu hépatique, ce qui pourrait masquer un effet de p38 cellule-dépendante. Ces travaux ont donc montré un rôle important de JNK dans la signalisation de l'APAP, mais ne permettent donc pas d'exclure définitivement un rôle de p38α. Le rat LEC (Long-Evans Cinnamon) mime la maladie humaine de Wilson caractérisée, entre autres, par une accumulation de cuivre, induisant la production de ROS et entrainant une hépatite fulminante. Dans ce modèle, l'activation de p38 est corrélée à la présence de lésions hépatiques (*Kadowaki et al., 2013*), l'injection d'un inhibiteur de p38 (SB 203580) réverse le phénotype. La mécanistique sous-jacente n'a cependant pas été étudiée. Une injection unique de tétrachlorure de carbone (CCl_4) entraine une réponse inflammatoire et des lésions hépatiques importantes. Xie et ses collaborateurs ont montré que les hépatocytes lésés par le CCl_4 sécrètent le facteur MIF (Macrophage Migration Inhibitor Factor), induisant alors la signalisation CD44/CD74 (*Xie et al., 2016*). En conséquence, p38 est alors activée ce qui permet ensuite la transcription du facteur MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1, aussi appelé CCL2), impliqué dans le recrutement des macrophages et des monocytes sur les sites endommagés. Lors d'un traitement par le CCl_4, l'homéostasie des acides biliaires est également altérée, l'expression du récepteur FXR (farnesoid X receptor) étant fortement diminuée (*Meng et al., 2010*). Un pré-traitement par l'acide obéticholique (OCA), un acide biliaire de synthèse activant le récepteur FXR, avant l'injection de CCl_4, réduit les dommages hépatiques par inhibition de l'apoptose (*Zhang et al., 2017a*). De plus, l'OCA permet la régulation de l'inflammation, inhibant chimiokines (Mcp-1 et Mip2) et gènes pro-inflammatoires (TNF-α et IL-1β) et favorisant les gènes anti-inflammatoires (IL-4). Parallèlement, il bloque l'activation de Akt et des MAPKs ERK et p38, indiquant un nouveau niveau de régulation de cette dernière. FXR a donc un rôle protecteur contre l'inflammation et les dommages liés au CCl_4. Ainsi, les agonistes synthétiques de FXR pourraient être impliqués dans les traitements contre les agressions aiguës du foie. Enfin, les travaux de Heinrichsdorff dans un modèle murin de mort cellulaire massive induit par la combinaison LPS/TNF, ont montré une

collaboration forte des voies p38α NF-κB, via la régulation de l'activité de JNK, dans la prévention des lésions hépatiques (*Heinrichsdorff et al., 2008*).

Modèle ALI	Modèle murin utilisé	Expression de p38	Conséquences sur les lésions hépatiques	Référence
α -Galcer	souris Lck-Cre^{+}-p38α$^{\Delta/\Delta}$	absence dans les NKT	fortement diminuées	(Nagaleekar et al., 2011)
ConA	souris Lck-Cre^{+}-p38α$^{\Delta/\Delta}$ souris Alb-Cre^{+}-p38α$^{\Delta/\Delta}$	absence dans les LT et NKT absence dans les hépatocytes	diminution (protection) aggravées	(Kang et al., 2015)
GalN/TNF-α	souris LysM-Cre$^{+/-}$- p38α$^{\Delta/\Delta}$	absence dans les macrophages	diminution	(Liu et al., 2017a)
APAP	souris p38α$^{+/-}$	absence hétérozygote mais diminution significative de p-p38 et p38 totale	pas de modification	(Nakagawa et al., 2008)
APAP	souris KD-p38α	absence	pas de modification	(Zhang et al., 2017b)
Surcharge en cuivre (maladie de Wilson)	rat LEC	activation	augmentation	(Kadowaki et al., 2013)
CCl_4	souris WT	activation	mises en place	(Xie et al., 2016)
CCl_4 + OCA	souris WT	Inhibition	diminution	(Zhang et al., 2017a)

Table 2. Tableau récapitulatif des différentes agressions aiguës du foie et leur effet sur p38 et les lésions hépatiques engendrées.

2.6. p38 et tumorigenèse hépatique

Outre ses fonctions hépatiques décrites ci-dessus dans divers processus cellulaires, l'implication de p38 a également été démontrée dans le développement du cancer du foie, comme lors de l'étape d'initiation suite à une hépatite induite par une infection virale. Par exemple, p38 est essentielle à la réplication du virus de l'hépatite B (HBV) dans les cellules Huh7 (*Chang et al., 2008*). En effet, l'inhibition de p38 par le SB203580 entraine un défaut de synthèse des ARN et des protéines virales, et ce, de façon dose-dépendante. Par ailleurs, la particule virale HBx issue de l'HBV a des effets anti-apoptotiques permettant alors la progression de la carcinogenèse dans les cellules Hep3B (*Kuo and Chao, 2010*). Hbx active p38 et SATB1 (Special AT-rich sequence-Binding protein-1), induisant une augmentation de la transcription de HURP (Hepatoma UpRegulated Protein), favorisant alors l'expression de gènes anti-apoptotiques (tels que celui de la survivine). Un taux élevé de HURP a été reporté dans les carcinomes hépatocellulaire (CHC), lui suggérant ainsi un rôle d'oncogène (*Tsou et al., 2003*).

Peu de données existent sur le rôle de p38 dans le développement d'un CHC chez l'homme, et ces dernières semblent divergentes. En 2003, Iyoda avait proposé un rôle dans la balance apoptose/prolifération puisqu'une diminution de l'activation de p38 a été retrouvée dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus non-tumoraux de 20 biopsies de patients d'étiologies variées (HCV,

HBV, hépatite chronique, cirrhose, fibrose) (*Iyoda et al., 2003*). Ceci est également corrélé à une diminution de son activateur MKK6. D'autre part, plus la taille de la tumeur est importante, moins p38 est phosphorylée. *A contrario*, l'analyse de 104 tissus cancéreux (là aussi d'étiologies différentes) a révélé une augmentation de la phosphorylation de p38 dans les tumeurs les plus larges (≥ 3 cms) et les tumeurs satellites, corrélée à une diminution de l'activation de JNK (*Wang et al., 2012*). De surcroit, les CHC avec les plus fortes activations de p38 présentent un faible taux de survie, parallèlement aux CHC avec une faible activation de p38 et une activation de JNK élevée qui ont une meilleure survie. Dans ce cas, l'activation de p38 aurait donc plutôt un effet promoteur dans le cancer du foie humain. En complément, Radalska a identifié des gènes impliqués dans la résistance au sorafenib, seul traitement proposé dans le CHC mais dont l'efficacité est variable (*Rudalska et al., 2014*). L'oncogène $Nras^{G12V}$ est administré au modèle murin cancéreux $p19^{Arf-/-}$ afin de permettre le développement de CHC multifocaux agressifs, les gènes d'intérêt sont ensuite mis en évidence à l'aide d'une banque de shRNA. L'inhibition de p38α est alors apparue comme une stratégie prometteuse pour améliorer l'efficacité du sorafenib. Ceci a également été confirmé dans des lignées cellulaires de CHC. De plus, les données suggèrent que l'inhibition de p38α entraine l'inhibition de la voie MEK-ERK dans les cellules de CHC traitées avec le sorafenib, permettant la réduction de la prolifération cellulaire comme le suggère la diminution de l'expression de la cycline A.

Afin de mieux déterminer l'impact de p38 et la signalisation impliquée dans le développement du CHC, différents modèles murins ont par ailleurs été mis en place. L'invalidation de p38α spécifiquement dans le foie (souris Alf-Cre-$p38\alpha^{-/-}$) ne présente pas de tumeurs spontanées à 1 an (*Hui et al., 2007b, 2007a*). Différemment, lors d'une tumorigenèse induite par injection de DEN (diéthylnitrosamine) combinée au phénobarbital (Pb), à 4 semaines post-natal, induisant la formation de CHC, le nombre, la taille et le poids total des tumeurs des souris déficientes pour p38α est supérieur à ceux des souris contrôles. De plus, les cellules tumorales présentent une augmentation de l'activité de JNK, une prolifération plus importante, mais l'incidence des processus de mort cellulaire est inchangée. De manière intéressante, la perte conjointe dans le foie de p38α et c-jun (cible de JNK) conduit à une réversion du phénotype, confirmant encore les relations étroites entre les 2 voies comme nous l'avons décrit précédemment. Il semblerait donc que la voie de signalisation JNK/c-jun soit une cible fondamentale de p38α dans la tumorigenèse hépatique, dans laquelle p38α aurait un rôle d'inhibiteur de la prolifération cellulaire. En 2008, l'équipe de Karin a complété cette mécanistique en utilisant un modèle murin présentant une invalidation de p38α dans le foie (Alb-Cre-$p38\alpha^{-/-}$) et l'injection de DEN à 14 jours post-natal (*Sakurai et al., 2008*). La signalisation induite par p38α dans les hépatocytes permet de prévenir l'accumulation de ROS et l'activation excessive de JNK. En effet, p38α active son substrat Hsp25 qui empêche l'accumulation de ROS et donc l'activation de CHOP en aval. Par ailleurs, p38α est également impliquée dans l'inhibition de IRF1 (Interferon Regulatory Factor 1) et d'une

MAP3K activatrice (non identifiée) de MKK4/7, empêchant ainsi l'activation prolongée de JNK induite par l'accumulation de ROS. Cependant, dans le cas de la perte de p38α dans les hépatocytes, ces voies induisent la mort cellulaire, entrainant la sécrétion de la cytokine IL-1α et l'activation de son récepteur IL-1R sur les cellules de Kupffer. p38α est alors activée dans ces macrophages, relarguant de l'IL-6 et favorisant la prolifération compensatrice des hépatocytes lésées, et par conséquent l'hépatocarcinogenèse (**Figure 25**).

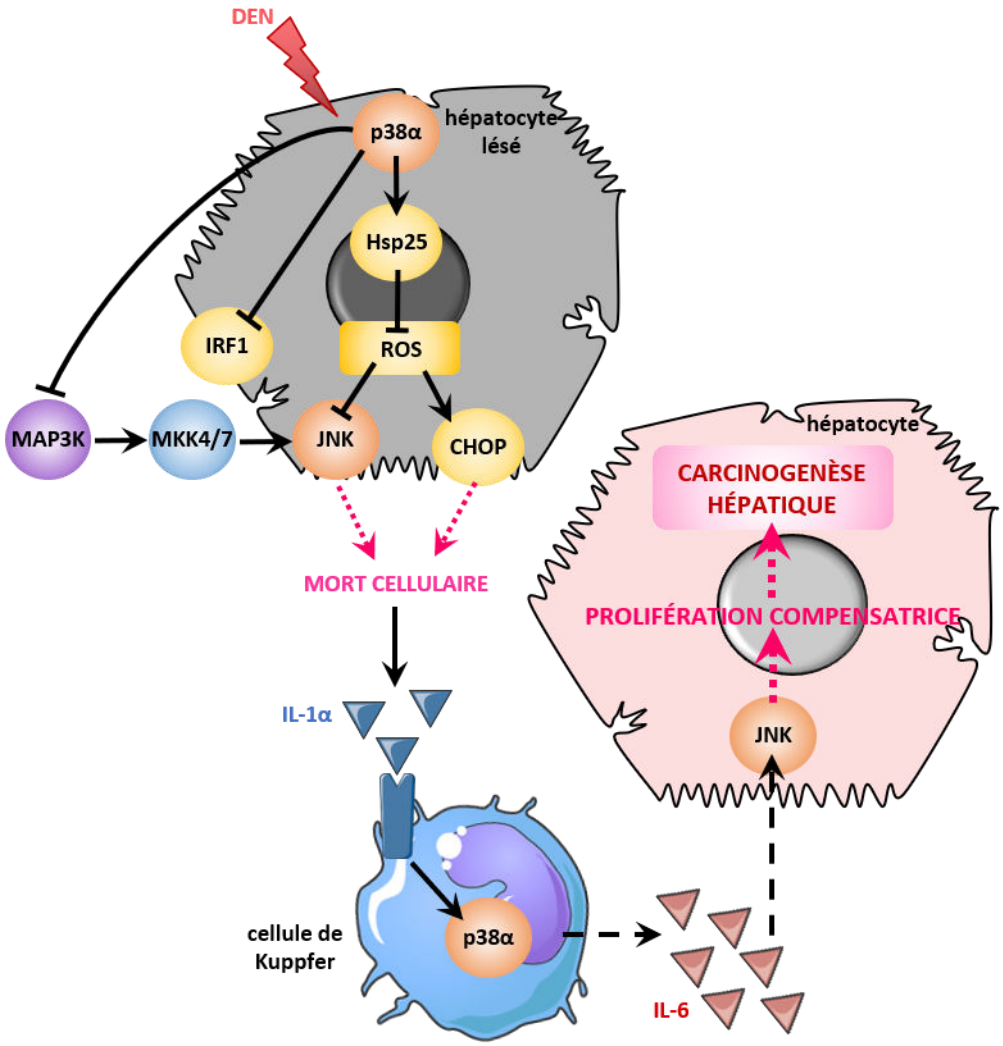


Figure 25. Représentation schématique de la voie de signalisation induite par p38α impliquée dans le développement du CHC favorisé par le DEN.

Lors du développement du CHC induit par le DEN, la perte de p38α entraine l'accumulation des ROS et l'activation prolongée de JNK dans les hépatocytes lésés. L'IL-1α sécrété par les hépatocytes morts active p38α dans les cellules de Kupffer qui relarguent de l'IL-6, stimulant la prolifération compensatrice et la tumorigenèse dans les hépatocytes restants. (Adaptée de *Min et al., 2011; Sakurai et al., 2008*)

Ces études sur les modèles murins KO p38 ont ainsi permis de révéler que p38α agit comme un suppresseur de tumeur dans des conditions pathologiques en réduisant l'accumulation de ROS et en

conférant ensuite une protection contre la mort cellulaire, la prolifération hépatocytaire compensatoire subséquente et la promotion des tumeurs du foie.

Le rôle des phosphatases de p38, en particulier DUSP28, a également été évoqué dans les travaux de Wang (*Wang et al., 2014a*). Tout d'abord, l'analyse d'une cohorte de 50 patients avec un CHC montre une augmentation de l'expression de DUSP28 dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus non-tumoraux. C'est également le cas dans la plupart des lignées cellulaires de CHC comparées aux cellules normales hépatiques. La surexpression de DUSP28 dans des lignées cellulaires de CHC favorise leur prolifération alors que le KD de DUSP28 a des effets antiprolifératifs. Ainsi, DUSP28 participe au développement du CHC, probablement dans la transition G1/S du cycle cellulaire, via p38 dont la phosphorylation est la seule à être régulée en réponse à un changement de l'expression de DUSP28 (l'activation de Erk1/2 et JNK n'étant pas modifiée). La sirtuine 1 (SIRT1) est un puissant oncogène dans la progression du CHC (*Chen et al., 2011*). La compréhension du mécanisme sous-jacent impliqué est importante afin d'envisager de nouvelles stratégies de traitement impliquant l'inhibition de SIRT1. Ainsi, Wang et collaborateurs ont montré une corrélation positive entre l'expression de SIRT1, la phosphorylation de p38 et la transformation tumorale dans des lignées cellulaires de CHC humaines et des foies de souris (*Wang et al., 2016*). Finalement, SIRT1 régule la transcription de YAP (Yes-Associated Protein) dans les hépatocytes tumoraux, elle-même favorise la transcription de MKK3 qui, en phosphorylant p38 dans le cytoplasme, permet sa translocation au noyau où elle active ses cibles, notamment celles impliquées dans la prolifération. Il semblerait donc qu'il faudrait au moins inhiber conjointement SIRT1 et YAP pour espérer pouvoir bloquer de façon efficace le développement du CHC. La place de p38 dans la tumorigenèse hépatique n'est pas simple et de nombreuses questions demeurent sans réponse. Cependant, les dernières études tendent à laisser penser que p38 serait plus un oncogène qu'un suppresseur de tumeur bien que, là encore, le débat soit ouvert, rendant ainsi l'identification des mécanismes en amont primordiale.

Modèle murin utilisé	Modèle de CHC utilisé	Phénotype	Mécanisme impliqué	Référence
Alf-Cre^{+}-p38α$^{-/-}$		Pas de tumeurs spontanées à 1 an		(Hui et al., 2007b)
Alf-Cre^{+}-p38α$^{-/-}$	DEN/Pb à 4 semaines	Augmentation du nombre, de la taille et du poids des tumeurs	JNK/c-jun	(Hui et al., 2007a)
Alf-Cre^{+}-p38α$^{-/-}$-c-jun$^{-/-}$	DEN/Pb à 4 semaines	Réduction des tumeurs	JNK	(Hui et al., 2007a)
Alb-Cre^{+}-p38α$^{-/-}$	DEN à 14 jours	Augmentation du nombre de tumeurs	JNK Hsp25 IL-1α	(Sakurai et al., 2008)
Alb-Cre^{+}-SIRT1$^{-/-}$	DEN à 12 semaines	Augmentation de la malignité	YAP MKK3 p38	(Wang et al., 2016)

Table 3. Tableau récapitulatif des souris KO p38α et SIRT1 dans la carcinogenèse hépatique.
(Adaptée de *Min et al., 2011*)

RESUME DU CHAPITRE 2

Dans ce second chapitre, nous nous sommes attelés à démontrer la complexité de la voie de signalisation de la MAPK p38.

- Les nombreux acteurs moléculaires impliqués dans ce réseau dense confèrent à p38 un rôle pléiotropique, comme dans le cycle cellulaire, la mort cellulaire, l'inflammation ou encore le métabolisme, largement dépendant des multiples stimuli pouvant activer la voie de signalisation, ainsi que du contexte cellulaire considéré.
- Il existe 4 isoformes de p38. Dans le foie, p38α est majoritaire, mais de récentes études font aussi émerger des rôles essentiels des protéines p38γ et p38δ, notamment au sein des cellules immunitaires.
- Les inhibiteurs pharmacologiques tels que le SB203580 apparaissent comme des outils utiles pour étudier l'impact de l'inhibition de p38α et p38β, mais pas des isoformes p38γ et p38δ pour lesquelles ils sont inefficaces.
- Dans le foie également, divers rôles ont été reportés en fonction des conditions physiopathologiques. p38 est aussi bien considérée comme un point de contrôle du cycle cellulaire des hépatocytes, un acteur clé dans la signalisation des ROS, un important médiateur au sein du système immunitaire, que comme un régulateur fondamental de la gluconéogenèse et la lipogenèse par exemple.
- Concernant la carcinogenèse hépatique (CHC), la place de p38 est assez discutée puisqu'elle pourrait exercer des actions oncogéniques mais aussi agir en tant que suppresseur de tumeur.
- En conclusion, nous avons vu qu'un même signal peut induire des fonctions distinctes de p38 dans les différentes cellules hépatiques, conférant à cette protéine une place de choix dans le maintien de l'homéostasie du foie.

OBJECTIFS & TRAVAUX

1. Préambule

Mes travaux de thèse, effectués sous la direction du Dr. Séverine Celton-Morizur, ont été menés dans le laboratoire « Cycle Cellulaire et Physiopathologies Hépatiques », dirigé par Chantal Desdouets. Depuis de nombreuses années, l'équipe s'intéresse au décryptage des mécanismes cellulaires et moléculaires régulant le processus de polyploïdisation hépatique à la fois dans un contexte physiologique (tels que le développement post-natal et la régénération hépatique), mais aussi au cours de pathologies hépatiques (en particulier les maladies métaboliques comme la NAFLD ou bien dans le cadre du carcinome hépatocellulaire, CHC). Les travaux de l'équipe, comme nous l'avons vu dans l'introduction, ont ainsi permis de montrer que la genèse des hépatocytes polyploïdes au cours du développement post-natal est un processus extrêmement régulé qui prend place dans un contexte de prolifération cloisonné, empêchant ainsi toute hyperpolyploïdisation du tissu hépatique (*Celton-Morizur et al., 2009; Margall-Ducos et al., 2007*).

Ces résultats suggèrent donc dans le foie, l'existence d'un ou de plusieurs points de contrôle du cycle cellulaire qui préviendraient toute prolifération excessive des hépatocytes polyploïdes. En conséquence, ils empêcheraient alors leur possible dérive vers un état aneuploïde ainsi que l'émergence d'une instabilité génomique, comme cela a déjà été démontré dans d'autres tissus en conditions pathologiques (*Davoli and de Lange, 2011*). Etant donné le potentiel oncogénique de ces cellules polyploïdes, des mécanismes dits « suppresseurs de tumeurs » existent afin de détecter la présence de ces cellules mais aussi pour limiter leur prolifération. La protéine p53, bien connue notamment pour son activité anti-tumorale et la protéine p38α, kinase du stress cellulaire, représentent deux acteurs clés de ces processus dans de nombreux tissus. L'activation de ces points de contrôle, séparément ou de concert, induit un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire de ces cellules polyploïdes. Ces dernières peuvent alors être éliminées par des voies apoptotiques ou bien être orientées vers un état sénescent (*Ganem and Pellman, 2007; Mikule et al., 2007; Talos et al., 2007; Vitale et al., 2008, 2010*).

Dans ce contexte, mon équipe a émis l'hypothèse que les protéines p53 et/ou p38α, dans le foie, pourraient donc contrôler spécifiquement la prolifération des hépatocytes polyploïdes. Ces travaux ont débuté en master 2 lors duquel je me suis consacrée plus particulièrement à l'étude de l'implication de la protéine p53 dans ces processus.

Par des approches *in vivo* (foie adulte normal et en régénération) et *ex vivo* (hépatocytes primaires) dans un modèle murin présentant une extinction de l'expression de p53 spécifiquement hépatocytaire ($p53^{\Delta H}$), j'ai mis en évidence que la perte d'expression de p53 conduit à une prolifération accrue des hépatocytes polyploïdes, à des altérations du cycle cellulaire et à la formation de mitoses aberrantes, qui participent à l'émergence de contingents cellulaires hautement polyploïdes, rarement observés dans le foie normal (**Figure 26**).

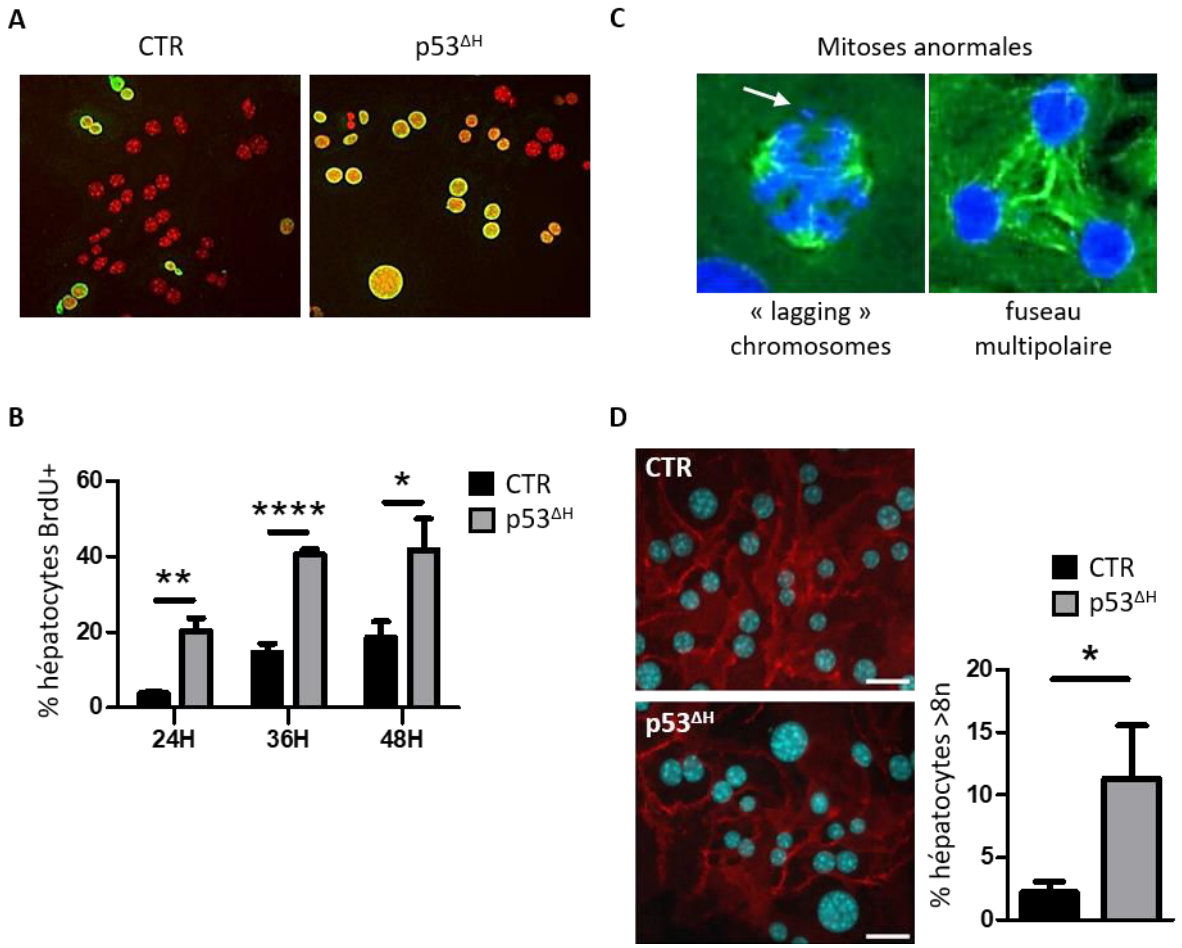


Figure 26. La perte d'expression de p53 (modèle murin p53$^{\Delta H}$) exacerbe la prolifération des hépatocytes, favorise les altérations mitotiques et induit l'émergence d'un contingent cellulaire hautement polyploïde (≥8n) dans le tissu hépatique.

A. Analyse de la prolifération des hépatocytes primaires après incorporation de BrdU. Immunofluorescence anti-BrdU (vert-jaune), marquage des hépatocytes en phase S, et Hoechst (rouge), marquage des noyaux, après 36H de culture.

B. Quantification des hépatocytes CTR (noir) et p53$^{\Delta H}$ (gris) BrdU positifs (N=4, *P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001).

C. Photos représentatives d'évènements de mitose anormale, dans le foie de souris p53$^{\Delta H}$, après immunomarquage anti-β-tubuline (vert), pour les fuseaux, et Hoechst (bleu), pour les noyaux. Panneau de gauche : anaphase tripolaire et « lagging » chromosome (flèche) ; Panneau de droite : fuseau multipolaire et répartition anormale du matériel génétique.

D. Analyse de la ploïdie nucléaire *ex-vivo*. Panneau de gauche: Photos représentatives d'hépatocytes issus de souris CTR et p53$^{\Delta H}$ après immunomarquage avec un anticorps anti-β-caténine (rouge) et Hoechst (bleu). (Objectif x20, échelle : 5µ). Panneau de droite : Graphique représentant le pourcentage d'hépatocytes mononucléés hautement polyploïdes (>8N) chez des souris CTR (noir) et p53$^{\Delta H}$ (gris). Normalisation des valeurs par rapport à la moyenne obtenue chez les souris CTR. (N=4 par groupe, *P<0.05).

Cependant, la parution d'un article dans Cell en Août 2014 (*Ganem et al., 2014*), démontrant un rôle spécifique de p53 dans la régulation de la prolifération des hépatocytes tétraploïdes, m'a contrainte à recentrer mon projet de thèse initial sur l'étude du rôle de la MAPK p38α dans le contrôle de la

prolifération et la polyploïdie hépatocytaire dans le foie adulte sain. Toutefois, les résultats que j'ai obtenus au début de ma thèse, comme nous le verrons dans la troisième partie, m'ont poussé dans une autre direction scientifique que celle initialement prévue. Cette partie commentée dans la dernière partie de ce volet sera présentée sous forme d'article.

2. Modèle d'étude

Afin d'étudier le rôle de la MAPK p38α dans le contrôle de la prolifération et la polyploïdie hépatocytaire du foie adulte, une nouvelle lignée murine a été générée par l'équipe. Ce modèle murin présente une délétion de p38α, spécifiquement dans les hépatocytes, réalisée grâce au système CreERT2-loxP. Brièvement, la souris p38α$^{fl/fl}$, où des séquences LoxP sont insérées dans les exons 2 et 3 du gène p38α a été croisée avec une souris exprimant la Cre recombinase sous contrôle du promoteur transthyrétine (TTR) hépato-spécifique et inductible par le tamoxifène (*Heinrichsdorff et al., 2008; Tannour-Louet et al., 2002*). Des descendants p38α$^{fl/fl}$ TTR-Cre^{-} et p38α$^{fl/fl}$ TTR-Cre^{+} ont été sélectionnés puis croisés entre-eux afin d'établir notre lignée d'étude finale. Le croisement de ces derniers nous permet ainsi d'obtenir au sein de la même portée, des souris p38α$^{fl/fl}$ TTR-Cre^{-} dites « contrôles, CTR » et des souris p38α$^{fl/fl}$ TTR-Cre^{+} dites « p38α$^{\Delta H}$ ».

Le tamoxifène est introduit par l'alimentation des souris (croquettes supplémentées en tamoxifène à la dose de 1000 mg/kg) à 4 semaines post-natal, permettant ainsi la délétion de *p38α* dans les hépatocytes matures (**Figure 27A**). Nous pouvons cependant remarquer une expression résiduelle de p38α dans les souris p38α$^{\Delta H}$ en raison de la présence de cellules dans le tissu hépatique non ciblées par le transgène TTR-Cre (cholangiocytes, cellules endothéliales, cellules immunitaires) (**Figure 27B**). Les souris sont manipulées puis sacrifiées deux semaines après l'arrêt de ce régime spécifique. L'élevage des souris s'effectue au sein d'une animalerie EOPS, dans des cages thermostatées (23°C ± 1°C), suivant un cycle lumière-obscurité de 12h (obscurité de 19h à 7h). Les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les expérimentations sont exclusivement effectuées sur des individus mâles, pour limiter toutes variations liées au sexe. La perte d'expression de p38α dans la souris adulte n'induit pas de défauts de santé et ces souris meurent de vieillesse. De plus, aucune tumeur spontanée n'apparait à 1 an de vie.

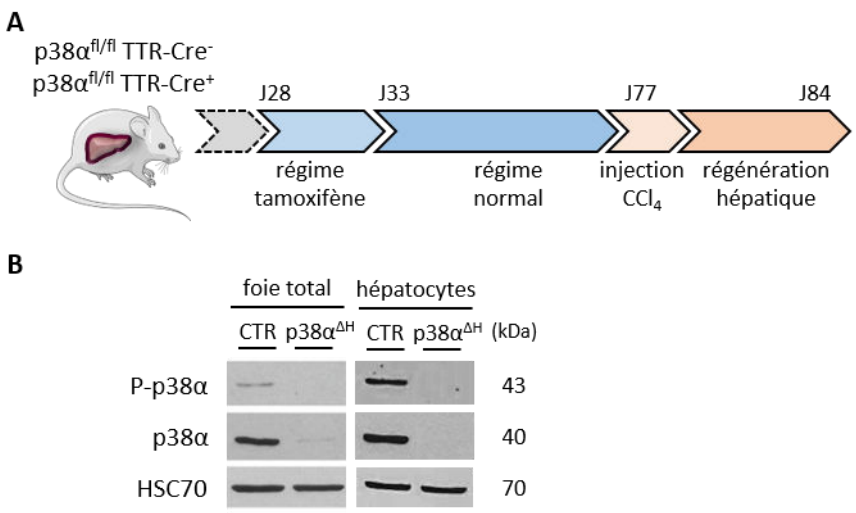


Figure 27. Modèle murin p38α$^{\Delta H}$ et procédure expérimentale d'injection du CCl_4.

A. Représentation schématique des processus induisant la perte d'expression de p38α puis d'injection du CCl_4. La régénération hépatique est complète 7 jours après l'injection CCl_4.

B. Analyse par western blot de l'expression de phospho-p38 et p38α dans le foie et les hépatocytes isolés de souris CTR et p38α$^{\Delta H}$ (échantillons représentatifs). L'HSC70 sert de témoin de charge.

3. Rôle de la MAPK p38α dans un foie adulte sain : prolifération et polyploïdie hépatocytaires

Comme évoqué précédemment, mon projet de thèse était en premier lieu consacré à définir si la MAPK p38α pouvait jouer un rôle dans l'homéostasie hépatique du foie adulte, notamment dans la régulation de la ploïdie physiologique et de la prolifération hépatocytaires.

Pour répondre à cette question, je me suis intéressée dans un premier temps à caractériser la ploïdie nucléaire (contenu en ADN de chaque noyau hépatocytaire) et cellulaire (nombre de noyaux par hépatocyte) des foies de souris p38α$^{\Delta H}$. L'analyse de la ploïdie nucléaire a été réalisée par une approche d'imagerie colorimétrique (marquage β-caténine/Hoechst sur coupe de tissu, **Figure 28A**) développée au laboratoire qui permet de discriminer les populations diploïdes (2n), tétraploïdes (4n) et octoploïdes ou plus (≥8n) en fonction de la taille et la circularité des noyaux des hépatocytes. L'analyse des tissus hépatiques sains de souris contrôles et p38α$^{\Delta H}$ âgées de 10 semaines ne montrent pas de différence significative dans la distribution des hépatocytes de différentes classes de ploïdie (**Figure 28B**). Concernant la ploïdie cellulaire, l'analyse menée sur les mêmes coupes tissulaires utilisées pour l'analyse de la ploïdie nucléaire, ne révèle pas de différences dans le taux de binucléation du foie de souris exprimant ou non la protéine p38α (**Figure 28C**).

Ces données indiquent donc que la perte d'expression de p38α au sein du tissu hépatique ne modifie la polyploïdie physiologique. Les travaux antérieurs du laboratoire ayant montré que la mise en place de cette dernière est liée au contexte prolifératif du tissu hépatique, j'ai par conséquent vérifié que la prolifération des hépatocytes adultes n'était pas altérée en absence de p38α (*Celton-Morizur et al.,*

2009). L'immunohistochimie anti-BrdU *in situ* confirme bien que la perte de p38α ne change pas le taux de prolifération basal des hépatocytes (**Figure 28D**).

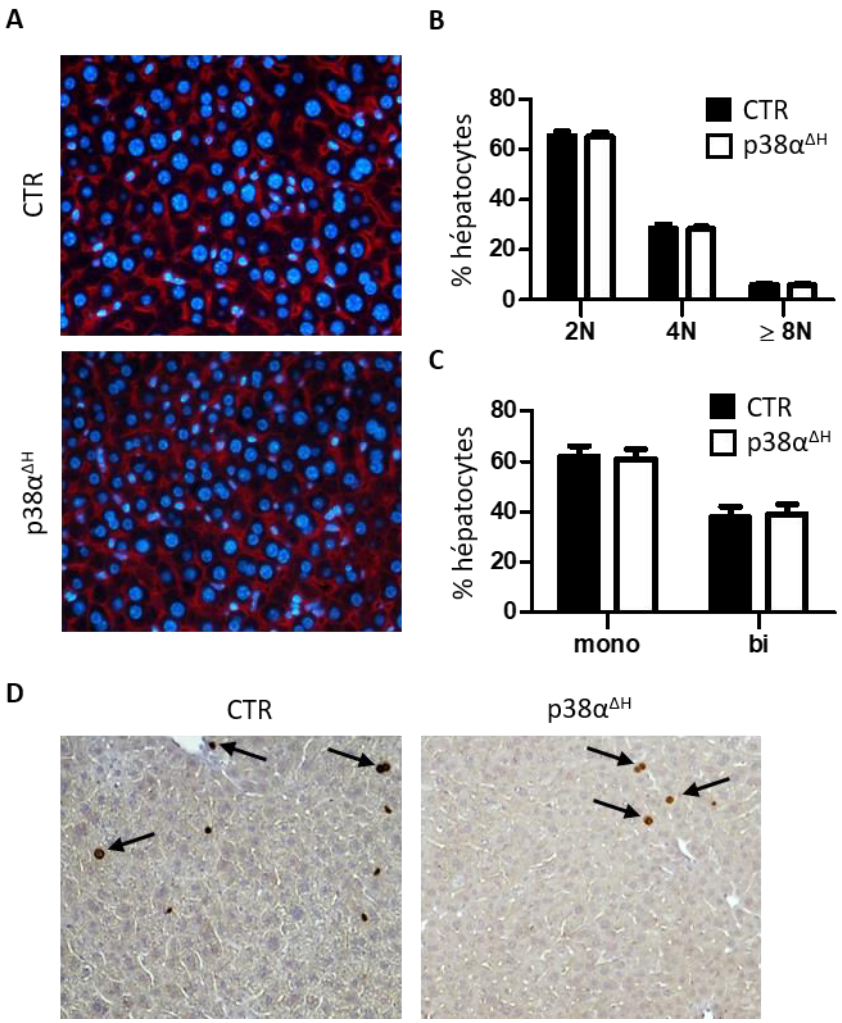


Figure 28. L'absence de p38α dans un foie adulte quiescent n'induit pas de modifications de la ploïdie et de la prolifération.

A. Immunofluorescence anti-β-caténine (rouge), marquage des membranes cytoplasmiques, et Hoechst (bleu), marquage des noyaux, sur sections de foie de souris CTR et p38α$^{\Delta H}$.
B. Quantification des hépatocytes selon la ploïdie nucléaire des souris CTR (noir) et p38α$^{\Delta H}$ (blanc).
C. Quantification des hépatocytes selon la ploïdie cellulaire des souris CTR (noir) et p38α$^{\Delta H}$ (blanc).
D. Immunomarquage anti-BrdU (marron), hépatocytes en phase S (flèche noire), et hémalun (violet).

Enfin, afin de m'affranchir du fait qu'un mécanisme compensatoire médié par un autre type cellulaire exprimant la protéine p38α aurait pu masquer l'effet potentiel de la perte de p38α sur la prolifération hépatocytaire dans mes analyses *in vivo*, j'ai complété ces observations par une approche *ex vivo* de culture primaire d'hépatocytes. Cette technique permet notamment d'étudier leur prolifération dans un contexte cellule-autonome.

A l'aide d'incorporation de BrdU sur des pulses longs de 12 heures, à 24, 36 et 48 heures de culture et grâce à une analyse immunohistochimique avec un anticorps anti-BrdU, j'ai tout d'abord observé que les hépatocytes issus de foie de souris p38α$^{\Delta H}$ ne prolifèrent pas spontanément. En effet, comme pour les hépatocytes issus du foie de souris contrôles, l'ajout de mitogènes dans le milieu de culture est nécessaire pour permettre aux hépatocytes de passer le point de restriction en fin de phase G1 du cycle cellulaire et de progresser en phase S. Par ailleurs, je n'ai observé aucune différence dans la progression en phase S (**Figure 29**), ni dans la progression en phases G2 et M des hépatocytes issus de souris p38α$^{\Delta H}$ comparés aux contrôles (analyses du marqueur phospho-histone H3 ; données non présentées). Ces résultats ont été confirmés par l'analyse des niveaux d'expressions des cyclines D1, E, A2 et B1, acteurs clés dans la progression en phases G1, G1/S, S et G2/M respectivement (western blots ; données non présentées).

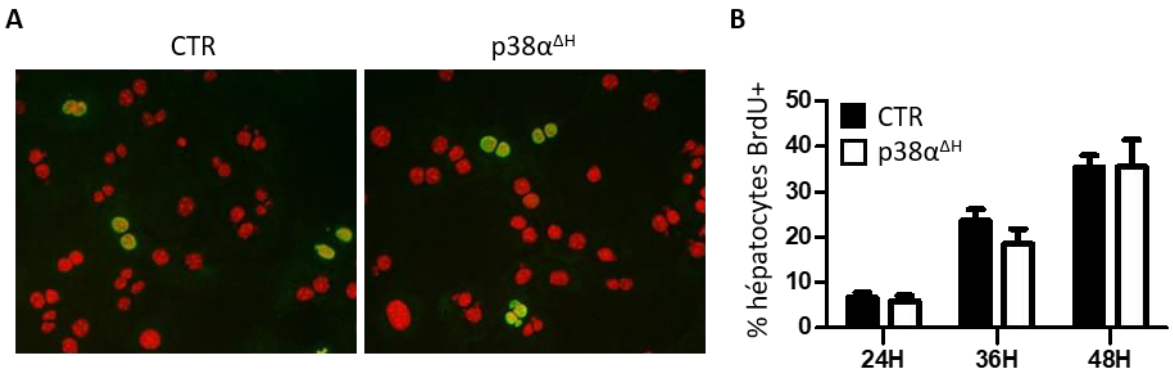


Figure 29. La délétion hépatocytaire de p38α ne modifie pas la progression en phase S des hépatocytes.

A. Immunofluorescence anti-BrdU (vert-jaune), marquage des hépatocytes en phase S, et Hoechst (rouge), marquage des noyaux, après 36H de culture.

B. Quantification des hépatocytes issus de souris CTR (noir) et p38α$^{\Delta H}$ (blanc) BrdU positifs.

Contrairement à ce qui était attendu, j'ai ainsi démontré que la perte d'expression hépatocytaire de *p38α* dans le foie adulte sain n'induit pas de modifications majeures de la prolifération des hépatocytes, ni d'altérations de la polyploïdie.

L'étude de cet axe de mon projet doctoral m'a donné l'opportunité de participer à l'amélioration de la technique de culture primaire d'hépatocytes. Le développement de cette expertise m'a alors permis d'être premier signataire d'une revue méthodologique mise en annexe, parue dans Methods Cell Biology en 2017, "Incomplete cytokinesis/binucleation in mammals: The powerful system of hepatocytes" (*Fortier et al., 2017*). De plus, cela m'a également donné l'occasion de prendre part à un projet de l'équipe en collaboration avec Rozenn Riou, doctorante dans le groupe de Sabine Colnot à

l'Institut Cochin, portant sur le rôle d'ARID1A, un facteur remodelant la chromatine, dans la prolifération hépatocytaire. A l'aide d'un modèle murin dans lequel *Arid1A* est spécifiquement délété dans les hépatocytes, nous avons mis en évidence un phénotype de mort cellulaire associé à des dommages de l'ADN lorsque les hépatocytes sont isolés du microenvironnement hépatique.

4. Rôle de la MAPK p38α dans les agressions aiguës du foie adulte

Les résultats de ce travail sont résumés en français (les figures citées correspondent aux figures du manuscrit) puis seront présentés sous forme de manuscrit en anglais (Introduction – Matériels et Méthodes – Résultats – Discussion – Références – Légendes des figures et Figures).

La perte d'expression de p38α dans un foie adulte quiescent n'induisant pas de changements particuliers au niveau de la polyploïdie et la prolifération hépatocytaires, nous nous sommes alors demandés quel pouvait être l'impact d'une délétion de p38α dans un modèle pathologique associant lyse hépatocytaire et forte régénération hépatique. Pour notre étude, nous avons choisi le modèle de stress aigu induit par l'hépatotoxine CCl_4 (le tétrachlorure de carbone). Ce modèle largement utilisé et décrit, permet notamment de mimer la toxicité hépatique que l'on peut observer chez l'homme et d'étudier les mécanismes mis en jeu pour favoriser un retour à l'homéostasie tissulaire (*Liedtke et al., 2013; Maes et al., 2016*). Une injection unique de cet hépatotoxique entraine une cytolyse hépatocytaire dans les zones centro-lobulaires rapidement suivie par une infiltration de cellules immunitaires et une prolifération compensatoire des hépatocytes sains, pour réparer le tissu lésé (Recknagel et al., 1989).

Au préalable, nous avons analysé par western blot l'activation (phosphorylation des thréonine 180 et tyrosine 182) de p38 dans des foies contrôles (CTR) en réponse à l'injection de CCl4 et ceci sur une cinétique s'étalant de 0 à 72 heures. Nos analyses moléculaires montrent que la protéine p38 est activée à un niveau basal dans les foies quiescents CTR (**Figure 1B**). Puis, la phosphorylation de p38 augmente progressivement au cours de la cinétique post-CCl4 (**Figures 1B et C**). L'activation de p38 semble par ailleurs être en corrélation avec l'apparition des dommages hépatiques (visualisés notamment par les zones de cytolyse (**Figure 1F**) et les niveaux sériques d'ALT (**Figure 1G**).

La délétion hépatocytaire de p38α a un effet hépatoprotecteur contre les agressions aiguës du foie.

L'analyse des coupes de foies de souris $p38\alpha^{\Delta H}$ et de souris CTR, après coloration à l'Hémalun et l'Eosine (H&E) et quantification de l'aire des zones de cytolyse, montre que l'initiation de la cytolyse s'initie dans les mêmes proportions 24 heures après traitement par le CCl_4 dans les deux groupes de souris (**Figures 1E et F**). De manière intéressante, l'étendue des zones de cytolyse est significativement réduite dans les foies de souris $p38\alpha^{\Delta H}$ comparés aux souris CTR à partir de 40 heures et jusqu'à 60

heures post-CCl_4 (**Figure 1F**). Ceci est également corrélé au niveau d'ALT, dont le taux est diminué dans le sérum des souris p38$\alpha^{\Delta H}$ par rapport aux souris CTR à 40 et 48 heures post-CCl_4 (**Figure 1G**). Concernant la mort cellulaire, nous n'avons pas observé d'altération de l'apoptose, après immunohistochimie marquant la caspase 3 clivée, laissant supposer qu'elle ne contribue pas à la réduction des dommages hépatiques chez les souris p38$\alpha^{\Delta H}$ (**Figures S1A et B**). De plus, la métabolisation du CCl_4 a lieu de la même manière chez les souris contrôles et p38$\alpha^{\Delta H}$, l'expression de *Cyp2e1* ne différant pas entre les deux groupes (**Figure S1C**). En complément, nous avons observé une augmentation de l'expression du *Collagène 1α* dans les foies p38$\alpha^{\Delta H}$ par rapport aux CTR à 40 heures post-CCl_4, reflétant une réparation tissulaire précoce en absence de p38α.

Afin de confirmer le rôle de p38α dans l'agression aiguë du foie, nous avons utilisé un second modèle, celui induit par l'injection d'une dose hépatotoxique d'APAP. Comme pour le CCl_4, nous avons observé une réduction de l'aire des zones de cytolyse à 24 et 48 heures post-APAP (**Figures S2A et B**), et une diminution du taux d'ALT (**Figure S2C**) dans les souris p38$\alpha^{\Delta H}$ par rapport aux CT.

Ainsi, l'ensemble de ces données indiquent que la délétion de p38α limite les dommages hépatiques induits par le CCl_4 et favorise une meilleure réparation tissulaire.

La réponse proliférative hépatocytaire induite par le CCl_4 n'est pas modifiée dans les souris p38$\alpha^{\Delta H}$.

Au regard de la littérature décrivant p38α comme un régulateur négatif de la prolifération, nous avons émis l'hypothèse que la prolifération hépatocytaire pourrait être exacerbée dans notre modèle murin et participerait ainsi à l'effet protecteur. Or, de manière inattendue, la cinétique de la prolifération hépatocytaire établie par incorporation de BrdU montre une diminution globale de cette dernière à 40 et 48 heures post-CCl_4 en absence de p38α (**Figures 2A et B**). De surcroit, l'analyse du nombre d'hépatocytes en phase G2 et en mitose (marqués positivement pour la Phospho-Histone H3) renforce ces observations (**Figures 2C et D**). L'expression protéique des cyclines D1, A2 et B, respectivement impliquées dans la progression en phase G1, en phase S et en G2/M du cycle cellulaire, ne diffèrent pas entre les souris CT et p38$\alpha^{\Delta H}$ (**Figure 2E**). Par conséquent, ces données indiquent que la perte d'expression de p38α n'impacte pas la réponse proliférative lors d'une agression aiguë du foie chez la souris p38$\alpha^{\Delta H}$ et que l'hépatoprotection observée est indépendante du rôle de p38α en tant que point de contrôle du cycle cellulaire.

L'amplification de la réponse antioxydante permet la protection contre les lésions induites par le CCl_4 en absence de p38α.

Nous avons pu voir dans l'introduction que la métabolisation du CCl_4 engendre un important stress oxydant, causant alors de sévères dommages hépatiques. La quantification du niveau de ROS, diminués chez les souris p38$\alpha^{\Delta H}$ par rapport aux souris CT à 40 heures post-CCl_4 (**Figures 3A et B**), associée à

l'analyse de l'expression de marqueurs tels que *Nrf2* (**Figure 3C**), et ses cibles *Ho-1* (**Figure 3D**), *Gstm3* (**Figure 3E**) et la *Catalase* (**Figure 3F**) (significativement augmentées en absence de p38α), indiquent la mise en place d'une réponse antioxydante chez les souris p38α$^{\Delta H}$, pouvant alors participer à la protection du tissu.

La délétion de p38α influence la réponse inflammatoire au cours d'une agression aiguë hépatique.

Fait intéressant, l'analyse des colorations H&E révèle d'importants infiltrats immunitaires dans les zones de cytolyse dans les foies de souris p38α$^{\Delta H}$ par rapport aux CTR (**Figure 4A**). Nous avons confirmé ces observations par cytométrie en flux en sortant les cellules immunitaires CD45^{+} des foies CTR et p38α$^{\Delta H}$. Nos résultats montrent une augmentation du nombre de ces cellules dans les foies p38α$^{\Delta H}$ comparés aux foies CTR à 40 heures post-CCl_4 (**Figure 4B**). De plus, bien que ce nombre diminue à 60 heures, il reste tout de même plus élevé dans les foies p38α$^{\Delta H}$ par rapport aux CTR (**Figure 4B**). En corrélation, les niveaux d'expression des chimiokines, *Ccl2* et *Ccl5*, sont augmentés à 40 heures post-CCl_4 dans les foies de souris p38α$^{\Delta H}$, suggérant fortement la participation de ces dernières dans le recrutement massif des cellules immunitaires (**Figures 4C et D**). Par ailleurs, nous avons observé la coexistence de deux voies couramment impliquées dans l'inflammation, l'une médiée par le TNFα, et l'autre par le TGFβ, et ceci sans modification de l'IL-1β (augmentation des niveaux de transcrits de *Tnfα* et *Tgfβ* à 40 heures post-CCl_4 dans les foies de souris p38α$^{\Delta H}$) (**Figures 4E, F et G**). Ces données sont en faveur d'une meilleure réparation tissulaire via l'installation d'une réponse inflammatoire spécifique.

Afin de confirmer l'implication des cellules immunitaires dans le phénotype d'hépatoprotection des souris p38α$^{\Delta H}$ lors d'une agression aiguë, les signaux chimiotactiques ont été bloqués par injection d'anticorps anti-Ccl2 combiné à un anti-Ccl5 à 40 heures post-CCl_4 (**Figure 5A**). La diminution du nombre des cellules immunitaires CD45^{+} dans les foies des souris CTR et p38α$^{\Delta H}$ permet de valider l'action des anticorps (**Figure 5B**). Fait intéressant, l'inhibition du recrutement local des cellules immunitaires aggrave les lésions hépatiques (augmentation de l'aire des zones de cytolyse) aussi bien chez les souris CTR que p38α$^{\Delta H}$, mais dans des proportions plus importantes chez ces dernières (facteur de 2,1 pour les souris p38α$^{\Delta H}$ entre les conditions avec et sans anticorps, facteur de 1,7 pour les souris CTR) (**Figure 5C**). De plus, la réponse antioxydante précédemment observée est particulièrement atténuée (réduction de l'expression de *Nrf2*, *Ho-1* et *Gstm3*) chez les souris p38α$^{\Delta H}$ à la suite de la déplétion par rapport à la condition contrôle, de même que l'expression du *Tnfα*, *Tgfβ* et *Collagène 1α* qui est également diminuée (**Figures 5D, E et F**). Par conséquent, l'inhibition du recrutement des cellules immunitaires empêche la réparation efficace du tissu hépatique.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats révèle que, lors d'une agression aiguë du foie, l'absence de p38α a un effet hépatoprotecteur en contrôlant le recrutement des cellules immunitaires, via des signaux chimiotactiques essentiels (Ccl2 et Ccl5) et deux voies de signalisation de l'inflammation (TNFα et TGFβ), afin de favoriser la réparation du tissu et maintenir l'homéostasie hépatique (**Figure 30**).

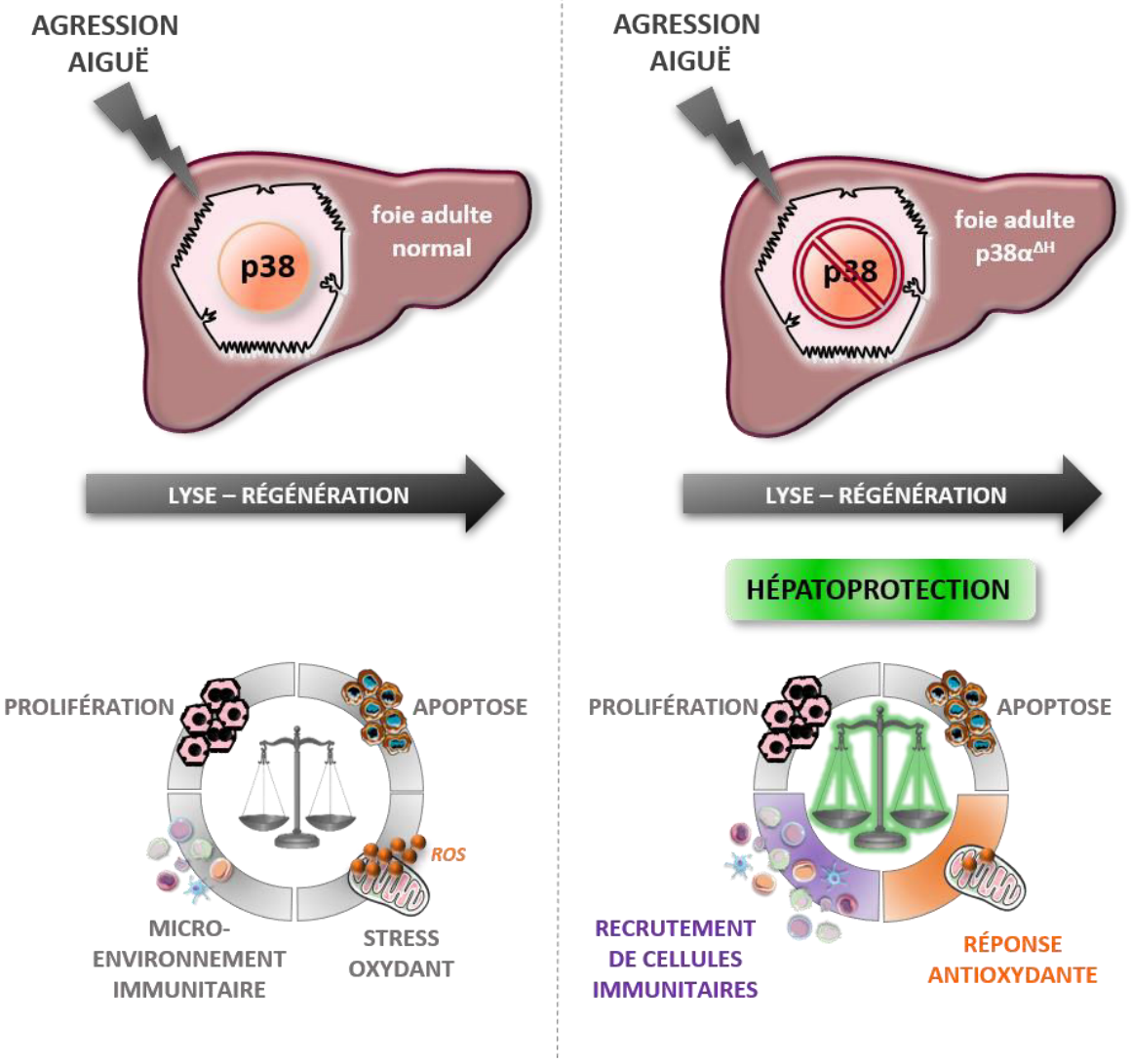


Figure 30. L'absence de p38α est hépatoprotectrice au cours d'une agression aiguë.

Une agression aiguë du foie entraine une cytolyse hépatocytaire massive notamment due à une production exacerbée de ROS, à la mise en place d'une réponse inflammatoire médiée par le microenvironnement immunitaire et à l'activation d'une réponse prolifératives des hépatocytes sains afin de réparer le tissu lésé.
Dans ce même contexte pathologique, la perte de p38α est hépatoprotectrice. Elle limite les atteintes hépatiques en permettant l'induction d'une réponse antioxydante plus forte et un recrutement massif de cellules immunitaires, favorisant ainsi une réparation tissulaire et un retour à l'homéostasie hépatique plus précoces.

Publication

Hepatospecific ablation of p38α governs the inflammatory response to promote efficient tissue repair during acute liver injury

Manon Fortier[1,2,3], Mathilde Cadoux[1,2,3], Nadia Boussetta[1,2,3], Sandrine Pham[1,2,3], Jean-Pierre Couty[1,2,3,4], Chantal Desdouets*[1,2,3] and Séverine Celton-Morizur*[1,2,3,5].

[1] INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France

[2] CNRS, UMR8104, Paris, France

[3] Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

[4] Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

[5] Lead contact: Séverine Celton-Morizur, severine.morizur@inserm.fr

*Authorship note: Chantal Desdouets and Séverine Celton-Morizur contributed equally to this work.

Keywords: p38α MAPK, acute liver injury, CCl_4, APAP, hepatoprotection, immune response, Ccl2/Ccl5

Abbreviations: ALT: Alanine amino transferase; APAP: Acetaminophen; CCl_4: Carbon tetrachloride; MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase; TAM: Tamoxifène; TTR: Transthyretin; ROS: Reactive Oxygen Species

ABSTRACT

To prevent acute liver injuries induced by viral hepatitis, toxins or drug overload, liver activates different interconnected processes such as proliferation, inflammation or cell death. p38α MAP (Mitogen Activated Protein) kinase is at the crossroad of these pathways. In the liver, even if its role as a negative regulator of hepatocyte proliferation has been largely described, p38α may also harbor an oncogenic role involving cancer related-processes and notably inflammation. However, its function during an acute injury, in adult liver, remains uncharacterized. In this study, using mice that are deficient in p38α specifically in mature hepatocytes, we unexpectedly found that lack of p38α protected against acute injury induced by CCl_4 or APAP compounds. We demonstrated that the hepatoprotective effect mediated by p38α deletion alleviated ROS accumulation and shaped the inflammatory response to promote efficient tissue repair after CCl_4 exposure. Mechanistically, we provided strong evidence that Ccl2/Ccl5 chemotactic signals were crucial for a proper hepatoprotective response observed secondary to p38α ablation Indeed, antibody blockade of Ccl2/Ccl5 was sufficient to abrogate hepatoprotective effect through a concomitant decrease of both inflammatory cells and antioxidative response that results ultimately in higher liver damages. Our findings open new avenues to specifically target p38α as a promising therapeutic opportunity for the treatment of acute liver injury.

INTRODUCTION

Acute liver injuries (ALI) can be caused by drug, virus, alcohol, toxic chemical, and several other factors and is a common pathway to many liver diseases [1–5]. The pathogenesis of ALI involves inflammation, oxidative stress coupled to the production of reactive oxygen species (ROS) and hepatocyte cell death (apoptosis and necrosis) [6–9]. ALI are characterized by a rapid resolution and a complete restitution of normal organ architecture and function after the elimination of the cause. However, in some cases, ALI may progress to chronic liver injury, hepatic fibrosis, or even hepatocellular carcinoma [10,11]. Therefore, searching for new therapeutic strategies improving recovery process is critical for a better handling of liver diseases.

p38 Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are essential for the cellular response against injury by integrating a plethora of pathways including growth, inflammation, metabolism and apoptosis [12–14]. Among all p38 isoforms, p38α (MAPK14) is the best characterized and expressed in most cell types [15]. As mice lacking p38α isoform die in utero, due to angiogenic defects in the placenta and peripheral vessels [16–18], mice models harboring tissue-specific deletion of p38α have been developed. During liver regeneration following partial hepatectomy, mice with specific ablation of p38α in hepatocytes early in life exhibited enhanced hepatocyte proliferation revealing that p38α acts as an inhibitor of hepatocyte proliferation by antagonizing the activity of the JNK–c-Jun pathway [19–21]. By contrast, liver-specific ablation of p38α during chronic biliary cirrhosis reduced hepatocyte cell growth, caused mitotic blockade and cytokinesis failure impairing dramatically mice lifespan [22]. Studies in thioacetamide (TAA) and DiEthyl-Nitrosamine (DEN)-induced HCC mice models revealed that p38α acts as a tumor suppressor by curtailing ROS accumulation protecting against cell death, subsequent compensatory hepatocyte proliferation and liver tumor development [23–25]. Collectively, these studies highlight that p38α displays several functions that critically depend on the

physiopathological context. However, the impact of p38α deletion during acute liver injury in completely mature adult hepatocytes is still an open question.

In that context, to determine the role of p38α in the adult liver, we developed a tamoxifen-inducible hepatospecific mice model allowing the deletion of p38α only in mature hepatocytes. Using acute liver injury models, our findings reveal quite unexpectedly that p38α deletion is translated into a potent hepatoprotective response against liver injury. Interestingly, we demonstrated that p38α deficiency instructs the inflammatory response to promote efficient tissue repair.

MATERIALS & METHODS

Generation of Conditional Knockout Mice and Animal Care

Mice carrying two loxP sites flanking (floxed) exons 2 and 3, which include the ATP-binding site of the kinase domain of the p38α gene ($p38\alpha^{fl/fl}$) [26] were interbred with TTR-Cre-Tam mice expressing a tamoxifen-inducible Cre recombinase under the control of the hepatocyte-specific transthyretin promoter [27] to generate $p38\alpha^{\Delta H}$ ($p38\alpha^{fl/fl}$ TTR-Cre^{+}-Tam) on the C57Bl6J genetic background. In all experiments, littermate carrying the respective loxP-flanked alleles but lacking expression of the Cre recombinase were used at WT controls. All mice receive care in compliance with institutional guidelines regulated by the "Direction Départementale des Services Vétérinaires de Paris", France (authorization number 75-956). Mice were kept under a controlled humidity and lighting schedule with a 12 h dark period with free access to food and water. To induce specific hepatocyte p38α deletion, four weeks old male $p38\alpha^{\Delta H}$ were fed with tamoxifen diet (+1000mg/kg TAM A115-T7100, Ssniff, Germany) during five days.

Liver injury models

Experiments were performed on male mice between 8 and 10 weeks of age.

Acute CCl_4: CCl_4 (Merck, Germany) was administered intraperitoneally (IP) at 3,5mL/kg of body weight dissolved in a 1:10 ratio with sunflower oil. Two hours before tissue harvest, mice were intraperitoneally injected with 50 mg/kg of Bromodeoxyuridine (BrdU) (Merck, Germany). Mice were euthanized at 0, 12, 24, 40, 48, 60 and 72 hours post-CCl4. APAP overdose: after an overnight fast, mice were injected IP with a fresh suspension of APAP (Merck, Germany): 500 mg/kg of paracetamol dissolved in sterile NaCl/Alcohol mixture (50:50 V/V) and warmed to 42°C. Mice were euthanized at 0, 24 and 48 hours post-APAP. After sacrifice, part of liver tissue was fixed in 4% neutral buffered formalin for

immunohistochemistry analysis. The remaining liver tissue was flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used.

Antibody depletion experiment

Five hours before CCl_4 treatment, mice received a single IP injection of a cocktail of anti-Ccl2 (clone 2H5, Bio X Cell) antibody at a dose of 7.5 mg/kg and anti-Ccl5 antibody (clone 53405, R&D systems) at a dose of 1.0 mg/kg or control antibody (Polyclonal Armenian Hamster IgG, Bio X Cell; Normal Rat IgG control, R&D Systems). The efficacy of antibody depletion was evaluated 40 hours after CCl_4 treatment.

Serum Transaminase activity

Blood was collected from intracardiac puncture on anesthetized mice during time-course kinetic after CCl_4 or APAP treatments and the activity of serum alanine aminotransferase [ALT] was measured using the AU400 chemistry analyzer (Olympus) (Biochemistry Facility, CRI Institute, Paris, France).

Histology, immunohistochemistry

Tissue was fixed by incubation in 4% formol overnight at 4 °C and embedded in paraffin wax. Hematoxylin/eosin staining was carried out on 5-µm paraffin sections. For immunohistochemistry, liver sections (5µm) were de-paraffinized and incubated in citrate buffer at 95°C for 20 min for antigen retrieval. Sections were treated with 3% hydrogen peroxide for 15 min at room temperature and then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies including mouse anti-BrdU (1/400 dilution, Thermo Fisher, MA5-12502), rabbit anti-pHH3 (1/500 dilution, Millipore, 06-570) or rabbit anti cleaved-capase-3 (1/100, Cell Signaling, 9664). After three washes in PBS1X, tissue sections were incubated with

biotinylated anti-mouse/rabbit or rat IgG (1/200 dilution, Vector Laboratories, CA, USA) for 1 hr at RT and then washed three times in PBS1X, after which streptavidin–horseradish peroxidase conjugates (Vector Laboratories, CA, USA) were added and the slides incubated for 45 min. After three washes with PBS1X, DAB solution (Vector Laboratories, CA, USA) was added and the slides were counterstained with haematoxylin.

In situ detection of ROS.

Fresh cross sections (8 µm) of unfixed, frozen mouse livers were immediately incubated with 5 µM DHE at 37°C for 30 minutes in a humidified chamber, subsequently washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline, and coverslipped [28]. The fluorescence intensity of DHE staining was measured with ImageJ software.

Nonparenchymal cell isolation

As previously described [29], livers were harvested and perfused with Hank's balanced salt solution (1X HBSS) containing 10 mM HEPES, to remove circulating blood cells. The liver was passed through a stainless steel mesh in RPMI 1640 supplemented with 2% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco, ThermoFisher Scientific), 5 mM HEPES, 2 mM Glutamax (Gibco, ThermoFisher Scientific), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 5 x 10-5 M β-mercaptoethanol (Gibco, ThermoFisher Scientific). The liver cell suspension was collected and parenchymal cells were separated from nonparenchymal cells (NPCs) by centrifugation for 3 min at 800 rpm. The supernatant containing the NPCs was collected and centrifuged for 10 min at 1500 rpm. The pellet was then resuspended in 35% Percoll (GE Healthcare) diluted in RPMI 1640 supplemented with 2% FCS, 20 min at room temperature, at 2,000 rpm. The NPC fraction was collected at the bottom and the cells were collected by two rounds of centrifugation in ice-cold PBS. Red blood cells were removed by incubation with

lysis buffer ACK (0.15 M NH4Cl, 10 mM KHCO3 and 0.1 mM Na2EDTA, pH 7.2). Cells were then washed in RPMI 1640 containing 10% FCS and centrifuged for 10 min at 1,500 rpm. Cells were resuspended in serum-containing medium and viable NPCs were counted by a trypan blue exclusion method, and stored on ice until further use.

Flow cytometry

Flow cytometry was performed on a LSR II flow cytometer (BD Biosciences). Cells were incubated with the following antibodies: anti-CD45/Ly5 (30-F11), anti-CD11c (HL3), purchased from BD Pharmingen/Horizon and anti-CD11b (M1/70), anti-F4/80 (BM8) purchased from eBioscience, according to the manufacturer's recommendations. NPCs were identified according to cell surface expression of Ly5 to calculate the proportion and absolute numbers of immune cell subpopulations with FlowJo software (Tree Star Inc.).

Gene expression analysis

Total RNA from mouse liver tissue was extracted using Trizol (ThermoFisher Scientific). Purified RNA was then reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative PCR (q-PCR) was performed using a SYBR Luminaris Color HiGreen qPCR master mix (ThermoFisher Scientific) and specific primers (see Supplemental Table 1). The reactions were performed in 96-well plates in a LightCycler 480 instrument (Roche) with 40 cycles. We determined the relative amounts of the mRNAs studied by means of the second-derivative maximum method, with LightCycler 480 analysis software and 18s mRNA as the invariant control for all studies.

Western blotting analysis

Total proteins were extracted from snap-frozen livers as described previously [30]. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay (Bio-Rad Protein Assay).

Proteins (40µg) were resolved by SDS-PAGE and then transferred onto nitrocellulose membranes (0.45-µm pore size), which were incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Primary antibodies used for western blotting are referenced in Supplemental Table 2. The proteinbound primary antibodies were detected with an appropriate horseradish peroxidase–conjugated secondary antibody (ThermoFisher Scientific). Immunoreactive bands were revealed using the "Clarity Western ECL Substrate" purchased from Bio-Rad. Blots were exposed to Amersham Hyperfilm (GE Healthcare Life Sciences). In all immunoblotting, HSC70 was used to normalize the results. For protein quantification, densitometry analysis was performed using Image J 1.8.0_112. Data are presented as relative units, which represent the densitometric value for the phosphoprotein of interest that was normalized to the total levels of the same protein.

Image acquisition and analysis

Concerning HE, BrdU, PPH3 labelling, images were taken using a Nikon Statif Eclipse E600 microscope with x10 and x20 magnification, 1.4–0.7 NA PL-APO objectives, a DXM1200 cooled CCD camera (Nikon), and ACT-1 (version 2.63; Universal Imaging). For cleaved caspase 3 labelling, images were taken using an Olympus BX63F, at 4x magnification Uplan FLN objective, an Olympus DP73 camera and Metamorph software. Necrotic area were quantified by morphometric analysis using an open-source ImageJ software 1.8.0_112 in 5 fields at x10 magnification. For BrdU/PHH3 staining, 4000 hepatocytes (for each liver sample analyzed) were counted; at least 10 areas of 33,500 µm2 were analyzed. Cleaved-caspase 3 immunostaining was quantified by color segmentation using an open-source ImageJ software in 5 fields at 4x magnification. Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Software) was used for figure construction.

Statistical Analysis

Statistical significance was determined with a 2-tailed Student's t test performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc). All data are representative of 4 to 10 animals of each genotype and are expressed as mean ± SEM. A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

p38α deletion protects mice against acute hepatocellular damage.

Acute administration of carbon tetrachloride (CCl_4), is widely used in experimental animal models of liver failure that mimics human hepatic toxicity [31,32]. CCl_4 is a strong hepatotoxin that induces overproduction of ROS, lipid peroxidation of membranes, causes hepatocyte death and inflammation, resulting to severe hepatotoxicity [33,34]. Protection against apoptosis, inflammation and oxidative stress associated with a pro-regenerative response of the hepatocytes is crucial to ensure efficient tissue repair after detrimental CCl_4 exposure. First, to evaluate the activity of p38α during acute liver injury, control mice were injected by a single dose of CCl_4 and liver and sera were collected during time course kinetic (**Figure 1A**). As shown in Figure 1H, a single-dose of CCl_4 induced significant liver injuries reflected by hepatocyte cytolysis that we monitored by the evaluation of ALT plasma level. Indeed, ALT level picked from 24 and 48 hours (injury phase) post-injection of CCl_4 and gradually decreased at 60 and 72 hours (recovery phase) (**Figure 1H**). In that context, we investigated the profile of p38α phosphorylation/activation in the injured liver. To that end, p38α and Thr180/Tyr182 phospho-p38 protein levels were measured by western blot analysis in a time course experiment (**Figure 1B-C**). We first observed that the expression of p38α was stable all along the kinetic (**Figure 1B**). Second, whereas in the resting liver we detected a weaker signal of P-p38, the phosphorylation of p38 increased gradually after CCl_4 exposure, concomitant with the increasing tissue injury observed in the liver (**Figure 1H**) and reached a plateau at 40 hours until the end of the kinetic (**Figure 1B-C**). These findings indicated that acute liver injury mediated by CCl_4 exposure induced specific activation of p38. Interestingly, in another model of liver injury (two-third hepatectomy), the role of p38α as a negative regulator of hepatocyte

proliferation was intrinsically dependent of its unphosphorylated status, since inactivation of p38α was necessary for the early stages of liver regeneration [19,21,23].

To better characterize the role of p38α during CCl_4 injury, hepatocyte-specific deletion of p38α ($p38\alpha^{\Delta H}$) was achieved by crossing mice carrying conditional loxP-flanked p38α alleles ($p38\alpha^{fl/fl}$; [26]) with transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of the hepatospecific transthyretin promoter (TTR-Cre Tam; [35]). Tamoxifen diet induces very efficient ablation of p38α expression in the liver of $p38\alpha^{\Delta H}$ mice even though some remaining expression of p38α was visible due to the presence of nonparenchymal cells that are not targeted by the TTR-Cre transgene (**Figure 1D**). Interestingly, following p38α hepatospecific deletion ($p38\alpha^{\Delta H}$) and under steady state conditions, we did not observe any signs of alterations within liver parenchyma. From these results, we concluded that p38α expression in adult hepatocyte is not absolutely required to maintain liver homeostasis during steady-state conditions.

$p38\alpha^{\Delta H}$ mice and their respective controls were challenged by a single CCl_4 injection and we monitored in time the hepatocyte cytolysis and liver damage (**Figure 1E**). H&E staining of liver sections indicate that significant necrosis was already present from 24 hours in the liver of $p38\alpha^{\Delta H}$ and control mice (**Figure 1F**). Interestingly, necrotic areas increased gradually and peaked at 60 hours post-CCl4, to diminish at 72 hours in the liver of control mice (**Figure 1F-G**). However, although necrotic areas were still evident between 40 and 48 hours in the liver of $p38\alpha^{\Delta H}$ mice, the intensity of necrosis was markedly reduced as compared to the controls (**Figure 1F-G**). Accordingly, ALT levels in $p38\alpha^{\Delta H}$ mice remained strictly lower compared to control mice at these time points (**Figure 1H**). Furthermore, cleaved caspase-3 staining was used to examine apoptosis of hepatocytes in both group of mice at 24, 40 and 48 hours post CCl_4 treatment (**Figure Supplemental 1A**). Our observations revealed that apoptotic response consecutive to CCl_4 challenge was not impaired in $p38\alpha^{\Delta H}$ liver and could not account for the decrease in necrotic areas and ALT levels observed in p38α-related deficiency context (**Figure**

Supplemental 1B). To rule out the possibility that differential CCl_4 bioactivation could be responsible for the variation in the liver injury between control and p38α$^{\Delta H}$ mice, we measured mRNA level of cyp2e1, a major CCl_4-metabolizing enzyme. First, we did not find difference in the mRNA level of cyp2e1 under steady state conditions between both groups of mice (**Figure Supplemental 1C**). Moreover, consistent with previous reports [36,37], the CCl_4 treatment resulted in a decrease of mRNA cyp2e1 level between 6 and 24 hours, indicating the same metabolization process of CCl_4 compound in both groups of mice (**Figure Supplemental 1C**). Interestingly, we monitored collagen 1α mRNA levels and we found an up-regulation at 40 hours in the liver of p38α$^{\Delta H}$ mice as compared to control one (**Figure 1I**), reflecting an earlier tissue repair response under p38α deficiency. These findings suggest that p38α ablation in adult hepatocytes both buffers liver injury and favored a better response in tissue recovery.

To further confirm the protective role of p38α ablation during acute liver injury, we used a second murine model of drug-induced liver damage [38]. To that end, control and p38α$^{\Delta H}$ mice were treated with a single hepatotoxic dose of APAP (500 mg/kg). Importantly, APAP administration provoked less histological features of injury in p38α$^{\Delta H}$ compared to the control livers (**Figure Supplemental 2A-B**) associated with reduced serum ALT levels (**Figure Supplemental 2C**). Altogether, our data strongly strengthened that p38α deficiency protects liver against acute injury.

Proliferative response induced by acute CCl_4 was not affected by p38α ablation.

Since p38α MAPK has been largely reported as a negative regulator of cellular proliferation controling the induction of both G1/S and G2/M cell cycle checkpoints [39–42], we checked the consequences of p38α deficiency on hepatocyte proliferative response after CCl_4 exposure. We monitored bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (**Figure 2A**) in both control and p38α$^{\Delta H}$ livers during time-course kinetic. BrdU-positive hepatocytes were detected as soon as 40 hours

post-CCl_4 and the percentage of BrdU-positive hepatocytes peaked at 48 hours, to gradually decrease afterward, in both mice groups (**Figure 2B**). Contrary to what we expected, we did not observe a global enrichment of BrdU-positive hepatocytes in p38α$^{\Delta H}$ livers. In fact, BrdU immune-reactive cells were modestly decreased in p38α$^{\Delta H}$ livers compared to control livers at 40 and 48 hours post-CCl_4 exposure (**Figure 2B**). To reinforce these interesting results, we analyzed G2 phase and mitosis progression using PHH3 labeling (**Figure 2C-D**). In lines with the assessment of BrdU analysis in p38α$^{\Delta H}$ livers, the percentage of PHH3-positive hepatocytes was slightly reduced at 40 hours after CCl_4 exposure compared to control (**Figure 2D**). Moreover, molecular analysis of key drivers of cell cycle progression (cyclin D1 (G1 phase), A2 (S phase) and B1 (G2/M)), did not reveal significant differences between the two groups of mice (**Figure 2E**). Altogether, these data revealed that p38α deficiency did not impact on hepatocyte proliferation during acute injury. Importantly, our findings revealed that the hepatoprotective response driven by p38α deletion is largely independent of its known role of cell cycle checkpoint.

Enhancement of antioxidative response protect against CCl_4-mediated injury in the absence of p38α.

Since CCl_4 causes severe liver cell damages through a strong elevation of oxidative stress response [43,44] and that p38α is a mediator of the cellular redox balance in hepatocytes [24,25,45], we tested whether the hepatoprotective effects observed after p38α ablation could be attributable to an enhancement of the antioxidative response.

The general level of hepatic ROS was assessed by the fluorescent dye dihydroethidine (DHE) on fresh frozen liver sections from both control and p38α$^{\Delta H}$ mice (**Figure 3A**). Whereas no significant differences in ROS levels were observed at 24 hours post-CCl4 in the liver of both p38α$^{\Delta H}$ and control mice, we did notice, at 40 hours, that ROS accumulation was largely

decreased in p38α$^{\Delta H}$ livers (**Figure 3B**). This observation indicated that p38α deficiency dampened oxidative stress. To gain insights into the signaling pathway, we investigated the Nrf2-mediated signaling as an essential component for the inhibition of oxidative stress in mice during acute liver injury [46–48]. Interestingly, we found that Nrf2 transcripts (**Figure 3C**) and its downstream effectors Ho-1, Catalase and Gstm3 (**Figure 3C**) were significantly enhanced in p38α$^{\Delta H}$ compared to control livers at 40 hours post CCl_4 injury. These findings suggested that p38α deficiency is translated into a protective effect against CCl_4-induced ROS formation at least through Nrf2 pathway.

p38α deletion impacts on the inflammatory response during acute liver injury.

Interestingly, at the level of H&E staining, we observed along the kinetic read-out, a substantial increase of inflammatory cells within necrotic areas in p38α$^{\Delta H}$ compared to control livers (**Figure 4A**). We then extracted immune cells from the livers 29 and confirmed their increase in p38α$^{\Delta H}$ mice compared to control mice at 40 hours after CCl4 injury (**Figure 4B**). Interestingly, at 60 hours, the number of immune cells was down-regulated in p38α$^{\Delta H}$ liver but still remained higher than in control liver (**Figure 4B**). To go further, we monitored chemotactic signals, which play an essential role during acute liver injury by managing the migration of immune cells [49]. We found a significant up-regulation of both Ccl2 (**Figure 4C**) and Ccl5 (**Figure 4D**) at 40 hours post CCl4 challenge, suggesting that these chemokines favor the drastic immune cell recruitment in p38α$^{\Delta H}$ livers.

Next, we evaluated common genes involved in inflammation on whole liver tissue from both groups of mice. Importantly, at 40 hours post-injury, we found a concomitant up-regulation of *Tnfα* (**Figure 4E**) and *Tgfβ* (**Figure 4F**) without modifications in *Il1β* evel (**Figure 4G**) suggesting a particular inflammatory flavor sustaining tissue repair. Altogether, our data

suggested that the increase in immune cells could be involved into the hepatoprotective response driven by p38α ablation.

To finally prove that the recruitment of the immune cells mediated the hepatoprotective response driven by p38α deletion, we blocked Ccl2/Ccl5 signals using specific neutralizing antibodies 40 hours after CCl4 exposure (**Figure 5A**). Initially, we validated the effect of antibodies blockade by counting $CD45^+$ immune populations extracted from the livers and found a drastic decrease in the total number of immune cells (**Figure 5B**) in both groups of mice. In the meantime, we showed that antibody blockade provoked a dramatic abolishment of hepatoprotection in $p38\alpha^{\Delta H}$ livers through an amplification of necrotic regions (**Figure 5C**) associated with a reduced anti-oxidative response (**Figure 5D**). Moreover, we also found an accentuation of liver injury in control mice (**Figure 5C**), suggesting that these hepatoprotective immune cells already present in p38-proficient livers are massively recruited under p38α deficiency (**Figure 5B**). Interestingly, we found a clear reduction in the level of *Tnfα* and *Tgfβ* transcripts (**Figure 5E**) in both groups of mice concomitantly upregulated at 40 hours post CCl_4 challenge (**Figure 4E-F**). These findings indicated that the combination of these two signaling (Tnfα and Tgfβ) participate to the hepatoprotective response. Accordingly, downregulation of *Collagen 1α* level was also observed after Ccl2/Ccl5 blockade (**Figure 5F**), confirming the attenuation of liver tissue repair.

Altogether, our data clearly demonstrated the crucial requirement of these two chemotactic signals favoring the recruitment of immune cells to mediate the hepatoprotective response driven by p38α ablation.

DISCUSSION

Drug-induced liver injury and acute liver failure (ALF) remains a major problem in Western societies [50,51]. While significant progress has been made in the understanding of intracellular signaling mechanisms of toxicity related to various compounds in hepatocytes, e.g. paracetamol [52], there is still an urgent need to develop potent therapeutic strategies to circumvent ALI and ALF. ALI can be studied in animal models and in isolated hepatocytes and most mechanisms are translatable to humans [53,54]. Due to its strong ability to integrate a variety of signaling pathways, previous reports highlighted p38 Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) as potential appealing target to improve ALI outcome. Most of these studies were done using a hepatospecific ablation of p38α isoform arising either during foetal (hepatoblasts) or neonatal (immature hepatocytes) development [20,24,25,55]. As p38α plays a crucial role in cellular differentiation [56–58], we suppose that earlier deletion could impaired differentiation of hepatocytes and terminal liver maturation. In the present study, we developed a new inducible and hepatospecific mice model in which deletion of p38α isoform was completely deleted in mature hepatocytes. Until now, p38α ablation in the liver was shown as deleterious in different models of liver injury [22,26,59]. In this study, using acute liver injury models (CCl_4 and APAP), we demonstrate for the first time that p38α deletion generated a pro-hepatoprotective response against liver injury. Remarkably, we showed that p38α deficiency after CCl_4 exposure, shaped the inflammatory response to promote efficient tissue repair. Finally, we evidenced that hepatoprotective response driven by p38α ablation was critically dependent on Ccl2/Ccl5 chemotactic signals, as their blockade dramatically exacerbated liver injury.

Following injuries, p38α MAPK displayed a wide range of cellular responses to ensure the maintenance of tissue homeostasis. Due to its major role as a negative regulator of cellular proliferation [20,41,55], we expected to observe an extensive enhancement of hepatocytes proliferation secondary to p38α ablation. Differently, we found a lower proliferative response,

reflecting buffered injuries (concomitant decrease in necrotic areas and ALT levels) in p38α$^{\Delta H}$ liver as compared to control one. Importantly, our data showed that not only p38α ablation did not impair the proliferation of hepatocytes after CCl_4 exposure but also revealed that the function of p38α as cell cycle checkpoint does not account for the hepatoprotective effect. Our findings are quite novel, since increased proliferation has been until now considered a hallmark of p38α deficient cells [23].

Interestingly, we demonstrated that the deletion of p38α isoform in adult hepatocytes has strong repercussions on the immune microenvironment to mediate a potent hepatoprotective response favoring efficient hepatic tissue repair. Indeed, we found a drastic infiltration of immune cells mediated by Ccl2/Ccl5 chemokines. In addition, we clearly identified that Ccl2/Ccl5 chemotactic signals were crucial in that response as their neutralization sensitized to increase liver injury. Therefore, our findings highlight a new aspect in the pleiotropic role of p38α in hepatocytes during acute liver injury, as until now the beneficial effect of p38α deletion was strictly observed when performed in immune effectors such as liver myeloid cells or T/NKT cells [59,60]. Furthermore, the work of Kang and collaborators provided evidence that p38α ablation in hepatocytes was fueled by a drastic accentuation of liver injury associated with a massive inflammatory cell recruitment [59]. This study was conducted using a different model of acute liver injury (e.g. ConA). Collectively, these data underlie that the nature of stimuli-induced injury greatly influences the cellular response of p38α, as it does not trigger the same immune effectors involving preferentially either myeloid cells (e.g. CCl_4, APAP) or lymphoid T cell reservoir (ConA) [61]. Therefore, it turns out that depending on the initial stimuli, the flavor of the inflammatory response dictates the outcome of tissue response. Our work clearly strengthens the critical connection between hepatocyte and immune system during acute liver injury and calls into question about the molecular support of this dialogue. Further experiments are required to elucidate the nature of the effectors involved in hepatoprotection. It is

noteworthy that we found that the antioxidative response was determinant in the mediation of hepatoprotection in p38α$^{\Delta H}$ liver. Interestingly, Ccl2/Ccl5 antibody blockade considerably diminished this antioxidative response in our model. These observations are of importance as they illustrated that immune system could behave also as an additional partner to adapt the redox balance during liver injury [62].

Finally, due to very limited therapeutic options for the treatment of acute liver injury, our work provides another field of curative opportunities designed to inactivate specifically p38α in hepatocyte and manipulating immune response.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the core facilities of the Institut Cochin, INSERM U1016 UMR CNRS8104, Université Paris Descartes. This study was supported by grant from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). Manon Fortier was supported by a fellowship from Ecole Doctorale BioSPC, Université Paris Descartes and the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20170437207).

REFERENCES

1. Bernal, W. & Wendon, J. Acute Liver Failure. New England Journal of Medicine 369, 2525–2534 (2013).
2. Björnsson, E. S., Bergmann, O. M., Björnsson, H. K., Kvaran, R. B. & Olafsson, S. Incidence, Presentation, and Outcomes in Patients With Drug-Induced Liver Injury in the General Population of Iceland. Gastroenterology 144, 1419-1425.e3 (2013).
3. Franco, E. Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries. World Journal of Hepatology 4, 68 (2012).
4. Ingawale, D. K., Mandlik, S. K. & Naik, S. R. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): A critical discussion. Environmental Toxicology and Pharmacology 37, 118–133 (2014).
5. Rutherford, A. & Chung, R. Acute Liver Failure: Mechanisms of Hepatocyte Injury and Regeneration. Seminars in Liver Disease 28, 167–174 (2008).
6. Bantel, H. & Schulze-Osthoff, K. Mechanisms of Cell Death in Acute Liver Failure. Frontiers in Physiology 3, (2012).
7. Diehl, A. M. Cytokine regulation of liver injury and repair. Immunol. Rev. 174, 160–171 (2000).
8. Jaeschke, H., Williams, C. D., Ramachandran, A. & Bajt, M. L. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity: Acetaminophen hepatotoxicity and repair. Liver International 32, 8–20 (2012).
9. Kaplowitz, N. Mechanisms of liver cell injury. Journal of Hepatology 32, 39–47 (2000).
10. Cordero-Espinoza, L. & Huch, M. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. Journal of Clinical Investigation 128, 85–96 (2018).
11. Malhi, H. & Gores, G. J. Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury. Gastroenterology 134, 1641–1654 (2008).
12. Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 410, 37–40 (2001).
13. Cuenda, A. & Rousseau, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Biochim Biophys Acta 1773, 1358–75 (2007).
14. Nebreda, A. R. & Porras, A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. Trends in Biochemical Sciences 25, 257–260 (2000).
15. Raman, M., Chen, W. & Cobb, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs. Oncogene 26, 3100–3112 (2007).
16. Adams, R. H. et al. Essential Role of p38α MAP Kinase in Placental but Not Embryonic Cardiovascular Development. Molecular Cell 6, 109–116 (2000).
17. Mudgett, J. S. et al. Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 97, 10454–10459 (2000).
18. Tamura, K. et al. Requirement for p38α in Erythropoietin Expression. Cell 102, 221–231 (2000).

19. Campbell, J. S., Argast, G. M., Yuen, S. Y., Hayes, B. & Fausto, N. Inactivation of p38 MAPK during liver regeneration. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 43, 180–188 (2011).

20. Hui, L. et al. p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. Nat Genet 39, 741–9 (2007).

21. Stepniak, E. c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. Genes & Development 20, 2306–2314 (2006).

22. Tormos, A. M. et al. Liver-specific p38α deficiency causes reduced cell growth and cytokinesis failure during chronic biliary cirrhosis in mice. Hepatology 57, 1950–1961 (2013).

23. Hui, L., Bakiri, L., Stepniak, E. & Wagner, E. F. p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. Cell Cycle 6, 2429–33 (2007).

24. Sakurai, T. et al. Hepatocyte Necrosis Induced by Oxidative Stress and IL-1α Release Mediate Carcinogen-Induced Compensatory Proliferation and Liver Tumorigenesis. Cancer Cell 14, 156–165 (2008).

25. Sakurai, T. et al. p38 Inhibits Liver Fibrogenesis and Consequent Hepatocarcinogenesis by Curtailing Accumulation of Reactive Oxygen Species. Cancer Research 73, 215–224 (2013).

26. Heinrichsdorff, J., Luedde, T., Perdiguero, E., Nebreda, A. R. & Pasparakis, M. p38α MAPK inhibits JNK activation and collaborates with IκB kinase 2 to prevent endotoxin-induced liver failure. EMBO reports 9, 1048–1054 (2008).

27. Tannour-Louet, M., Porteu, A., Vaulont, S., Kahn, A. & Vasseur-Cognet, M. A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. Hepatology 35, 1072–81 (2002).

28. Gentric, G. et al. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest 125, 981–92 (2015).

29. L'Hermitte, A. et al. Lect2 controls inflammatory monocytes to constrain the growth and progression of hepatocellular carcinoma. Hepatology (2018). doi:10.1002/hep.30140

30. Celton-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D., Margall-Ducos, G. & Desdouets, C. The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. J Clin Invest 119, 1880–7 (2009).

31. Liedtke, C. et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. Fibrogenesis & Tissue Repair 6, 19 (2013).

32. Maes, M., Vinken, M. & Jaeschke, H. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. Toxicology and Applied Pharmacology 290, 86–97 (2016).

33. Martínez, M., Mourelle, M. & Muriel, P. Protective effect of colchicine on acute liver damage induced by CCl4. Role of cytochrome P-450. J Appl Toxicol 15, 49–52 (1995).

34. Recknagel, R. O., Glende, E. A., Dolak, J. A. & Waller, R. L. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. Pharmacol. Ther. 43, 139–154 (1989).

35. Tannour-Louet, M. A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. Hepatology 35, 1072–1081 (2002).

36. Knockaert, L. et al. Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. Laboratory Investigation 92, 396–410 (2012).

37. Tierney, D. J., Haas, A. L. & Koop, D. R. Degradation of cytochrome P450 2E1: selective loss after labilization of the enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 293, 9–16 (1992).

38. McGill, M. R. et al. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. Journal of Clinical Investigation 122, 1574–1583 (2012).

39. Ambrosino, C. & Nebreda, A. R. Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. Biol Cell 93, 47–51 (2001).

40. Lee, K., Kenny, A. E. & Rieder, C. L. P38 Mitogen-activated Protein Kinase Activity Is Required during Mitosis for Timely Satisfaction of the Mitotic Checkpoint But Not for the Fidelity of Chromosome Segregation. Molecular Biology of the Cell 21, 2150–2160 (2010).

41. Thornton, T. M. & Rincon, M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. Int J Biol Sci 5, 44–51 (2009).

42. Wong, E. S. M. et al. p38MAPK Controls Expression of Multiple Cell Cycle Inhibitors and Islet Proliferation with Advancing Age. Developmental Cell 17, 142–149 (2009).

43. Cichoż-Lach, H. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. World Journal of Gastroenterology 20, 8082 (2014).

44. Weber, L. W. D., Boll, M. & Stampfl, A. Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. Critical Reviews in Toxicology 33, 105–136 (2003).

45. Tormos, A. M., Taléns-Visconti, R., Nebreda, A. R. & Sastre, J. p38 MAPK: A dual role in hepatocyte proliferation through reactive oxygen species. Free Radical Research 47, 905–916 (2013).

46. Cai, Z. et al. N-acetylcysteine protects against liver injure induced by carbon tetrachloride via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. Int J Clin Exp Pathol 8, 8655–8662 (2015).

47. Jadeja, R. N., Upadhyay, K. K., Devkar, R. V. & Khurana, S. Naturally Occurring Nrf2 Activators: Potential in Treatment of Liver Injury. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2016, 1–13 (2016).

48. Xu, W. et al. The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis. Laboratory Investigation 88, 1068–1078 (2008).

49. Karlmark, K. R., Wasmuth, H. E., Trautwein, C. & Tacke, F. Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology 2, 233–242 (2008).

50. Bernal, W., Lee, W. M., Wendon, J., Larsen, F. S. & Williams, R. Acute liver failure: A curable disease by 2024? Journal of Hepatology 62, S112–S120 (2015).

51. Lee, W. M. Drug-induced Acute Liver Failure. Clinics in Liver Disease 17, 575–586 (2013).

52. Ye, H., Nelson, L. J., Moral, M. G. del, Martínez-Naves, E. & Cubero, F. J. Dissecting the molecular pathophysiology of drug-induced liver injury. World Journal of Gastroenterology 24, 1373–1385 (2018).

53. Jaeschke. Acetaminophen-induced Liver Injury: from Animal Models to Humans. Journal of Clinical and Translational Hepatology 2, (2014).

54. Maes, M., Vinken, M. & Jaeschke, H. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. Toxicology and Applied Pharmacology 290, 86–97 (2016).

55. Stepniak, E. c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. Genes & Development 20, 2306–2314 (2006).

56. Segalés, J., Perdiguero, E. & Muñoz-Cánoves, P. Regulation of Muscle Stem Cell Functions: A Focus on the p38 MAPK Signaling Pathway. Frontiers in Cell and Developmental Biology 4, (2016).

57. SéVerin, S., Ghevaert, C. & Mazharian, A. The mitogen-activated protein kinase signaling pathways: role in megakaryocyte differentiation. Journal of Thrombosis and Haemostasis 8, 17–26 (2010).

58. Tamura, K. et al. Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. Cell 102, 221–231 (2000).

59. Kang, Y. J., Bang, B.-R., Otsuka, M. & Otsu, K. Tissue-Specific Regulation of p38α-Mediated Inflammation in Con A–Induced Acute Liver Damage. The Journal of Immunology 194, 4759–4766 (2015).

60. Liu, J. et al. Deficiency of p38α in macrophage ameliorates D -galactosamine/TNF-α-induced acute liver injury in mice. The FEBS Journal 284, 4200–4215 (2017).

61. Khan, H. A., Ahmad, M. Z., Khan, J. A. & Arshad, M. I. Crosstalk of liver immune cells and cell death mechanisms in different murine models of liver injury and its clinical relevance. HBPD INT 16, 245–256 (2017).

62. Li, S., Hong, M., Tan, H.-Y., Wang, N. & Feng, Y. Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2016, 1–21 (2016).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. p38α ablation in mature hepatocyte is hepatoprotective against CCl_4-induced liver injury.

(A) Schematic representation of experimental procedure for CCl_4 injection in control mice.

(B) Immunoblot analysis of phospho-p38α and total p38α in control liver samples before (RL: resting liver) and after CCl_4 exposure. HSC70 served as a loading control. Lanes show samples from independent biological replicates and were noncontiguous.

(C) Densitometry analysis of P-p38 vs p38α protein levels before (RL: resting liver) and after CCl_4 injection. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 3$ per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

(D) Immunoblot analysis of phospho-p38α and total p38α in CTR and $p38\alpha^{\Delta H}$ liver samples in steady state conditions. HSC70 served as a loading control. Lanes show samples from independent biological replicates.

(E) Schematic representation of experimental procedure for CCl_4 injection in control and $p38\alpha^{\Delta H}$ mice.

(F) Representative photomicrographs of hematoxylin and eosin— stained liver sections from CTR and $p38\alpha^{\Delta H}$ mice at different time after CCl_4 injection (scale bar: 100 µm).

(G) Necrotic area quantification from H&E stained CTR and $p38\alpha^{\Delta H}$ liver sections at indicated time points after CCl_4 injection. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 7$ per group). *p<0.05, ***p<0.001

(H) ALT levels in CTR and $p38\alpha^{\Delta H}$ sera samples at indicated time points after CCl_4 injection. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 6$ per group). *p<0.05

(I) Relative mRNA level of *Collagen1α* measured by quantitative PCR in CTR and $p38\alpha^{\Delta H}$ liver samples at indicated time points after CCl_4 injection. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 6$ per group). *p<0.05

Figure 2. p38α deficiency did not impact on hepatocyte proliferation during acute injury.

(A) Representative BrdU immunochemistry of CTR and $p38\alpha^{\Delta H}$ liver tissue at indicated time points after CCl_4 injection (scale bar: 10 µm).

(B) Quantitative analysis of BrdU labeled CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver sections (percentage of BrdU^{+} hepatocytes). Data represent the mean ± SEM ($n \geq 6$ per group)*p<0.05

(C) Representative Phospho-Histone H3 (PHH3) immunochemistry of CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver tissue at indicated time points after CCl_4 injection (scale bar: 10 µm).

(D) Quantitative analysis of PHH3+ hepatocytes in G2 phase (left panel) and mitosis (right panel) in CTR and p38α$^{\Delta H}$ livers (histologic distinction of PHH3^{+} hepatocytes). Data represent the mean ± SEM ($n \geq 6$ per group). *p<0.05

(E) Immunoblot of proteins regulating cell cycle progression (Cyclin D1, A2 and B1) in CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver samples at indicated time points after CCl_4 injection. Two representative samples are shown for each analyzed point. HSC70 served as a loading control. Lanes were noncontiguous.

Figure 3. Enhancement of the anti-oxidant response in the liver of p38α$^{\Delta H}$ mice after acute CCl4 exposure.

(A) Representative images of DHE staining of CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver sections at 24 and 40 hours post-CCl_4 (scale bar: 30µm).

(B) Quantification of DHE fluorescence intensity (arbitrary unit) obtained from staining of CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver sections at 24 and 40 hours post-CCl_4. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 5$ per group).*p<0.05

(C) Relative mRNA level of antioxidant genes (*Nrf2*, *Ho1*, *Gstm3* and *Catalase*) measured by quantitative PCR in CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver samples at 24 and 40 hours post-CCl_4. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 6$ per group). *p<0.05, ***p<0.001

Figure 4. p38α deficiency instructs the inflammatory response to promote efficient tissue repair.

(A) Representative photomicrographs of immune infiltration with H&E staining in CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver sections at different time points after CCl_4 injection (scale bar: 50 µm).

(B) Number of hepatic immune cells per gram of liver in CTR and p38α$^{\Delta H}$ mice at 40 and 60 hours post-CCl_4. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 5$ per group). *p<0.05, **p<0.01

(C-G) Relative mRNA level of *Ccl2, Ccl5, Tnfα, Tgfβ and Il1β* measured by quantitative PCR in CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver samples at indicated time points after CCl_4 injection. Gene

expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 5$ per group). *p<0.05

Figure 5. Blockade of Ccl2/Ccl5 chemotactic signals impairs hepatoprotective effect coupled to p38α deficiency during acute liver injury.

(A) Schematic representation of experimental procedure for Ccl2 and Ccl5 blockade. Mice were sacrificed at 40 hours after CCl_4 injection.

(B) Number of immune cells per gram of liver in CTR and p38α$^{\Delta H}$ mice treated or not by Ccl2/Ccl5 antibodies, 40 hours after CCl_4 exposure. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 5$ per group). *p<0.05, **p<0.01

(C) Necrotic area analysis by liver section H&E staining of CTR and p38α$^{\Delta H}$ mice treated or not by Ccl2/Ccl5 antibodies (scale bar: 100 µm) and its quantification at 40 hours post-CCl_4. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 5$ per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

(D) Relative mRNA level of antioxidant genes (*Nrf2*, *Ho1* and *Gstm3*) measured by quantitative PCR in CTR and p38α$^{\Delta H}$ livers issued from mice treated or not by Ccl2/Ccl5 antibodies and its quantification at 40 hours post-CCl_4. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 3$ per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

(E) Relative mRNA level of *Tnfα* and *Tgfβ* measured by quantitative PCR in CTR and p38α$^{\Delta H}$ livers issued from mice treated or not by Ccl2/Ccl5 antibodies and its quantification at 40 hours post-CCl_4. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 3$ per group). *p<0.05, **p<0.01

(F) Relative mRNA level of *Collagen1α* measured by quantitative PCR in CTR and p38α$^{\Delta H}$ livers issued from mice treated or not by Ccl2/Ccl5 antibodies and its quantification at 40 hours post-CCl_4. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 3$ per group). *p<0.05, **p<0.01

Figure S1. Apoptosis and CCl_4 bioactivation are not impaired in p38a $^{\Delta H}$ mice during acute liver injury

(A) Representative Cleaved-Caspase 3 immunochemistry of CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver sections at indicated time points after CCl_4 injection (scale bar: 100 µm).

(B) Quantitative analysis of Cleaved-Caspase 3 labeled CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver sections (percentage of brown area). Data represent the mean ± SEM ($n \geq 4$ per group). *p<0.05

(C) Relative mRNA level of *Cyp2e1* measured by quantitative PCR in CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver samples before and after CCl_4 injection. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 6$ per group). *p<0.05

Figure S2. p38α deficiency protects the liver from APAP-induced injury

(A) Representative photomicrographs of necrotic area with H&E staining in CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver sections 24 hours after APAP injection (scale bar: 100 µm).

(B) Necrotic area quantification from H&E stained CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver sections at 24 and 48 hours after APAP injection. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 3$ per group). *p<0.05

(C) ALT levels in CTR and p38α$^{\Delta H}$ sera samples at 24 and 48 hours after APAP injection. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 3$ per group) *p<0.05

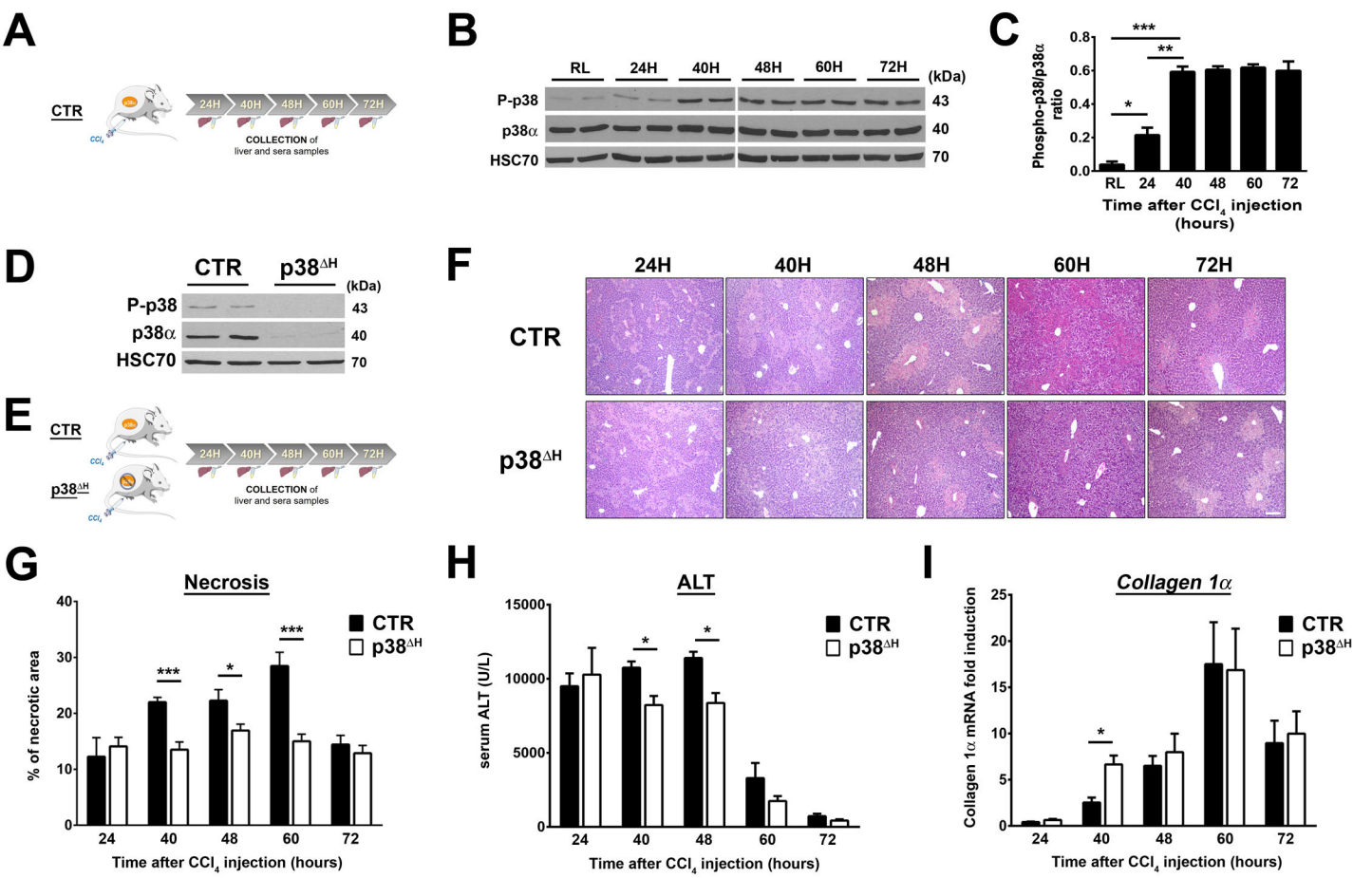

A
CTR
24H
40H
48H
60H
72H
COLLECTION of
liver and sera samples
B
RL
24H
40H
48H
60H
72H
(kDa)
P-p38
p38α
HSC70
43
40
70
C
Phospho-p38/p38α ratio
Time after CCl4 injection (hours)
D
CTR
p38ΔH
(kDa)
P-p38
p38α
HSC70
43
40
70
E
CTR
p38ΔH
24H
40H
48H
60H
72H
COLLECTION of
liver and sera samples
F
24H
40H
48H
60H
72H
CTR
p38ΔH
G
Necrosis
% of necrotic area
CTR
p38ΔH
Time after CCl4 injection (hours)
H
ALT
serum ALT (U/L)
CTR
p38ΔH
Time after CCl4 injection (hours)
I
Collagen 1α
Collagen 1α mRNA fold induction
CTR
p38ΔH
Time after CCl4 injection (hours)

Figure 1

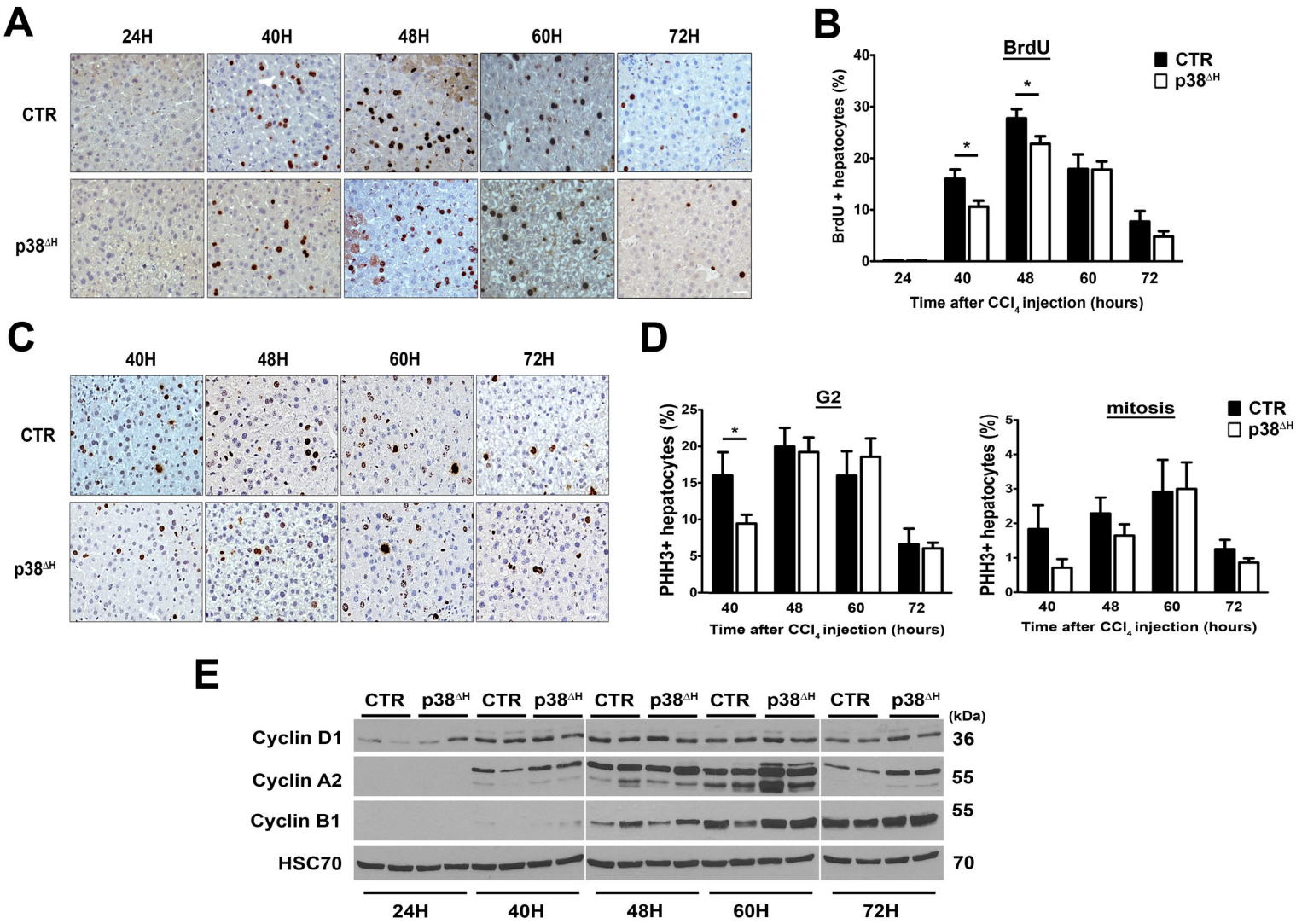

A
24H
40H
48H
60H
72H
CTR
p38ΔH
B
BrdU
CTR
p38ΔH
BrdU + hepatocytes (%)
Time after CCl4 injection (hours)
C
40H
48H
60H
72H
CTR
p38ΔH
D
G2
PHH3+ hepatocytes (%)
Time after CCl4 injection (hours)
mitosis
CTR
p38ΔH
PHH3+ hepatocytes (%)
Time after CCl4 injection (hours)
E
CTR
p38ΔH
(kDa)
Cyclin D1
Cyclin A2
Cyclin B1
HSC70
36
55
55
70
24H
40H
48H
60H
72H

Figure 2

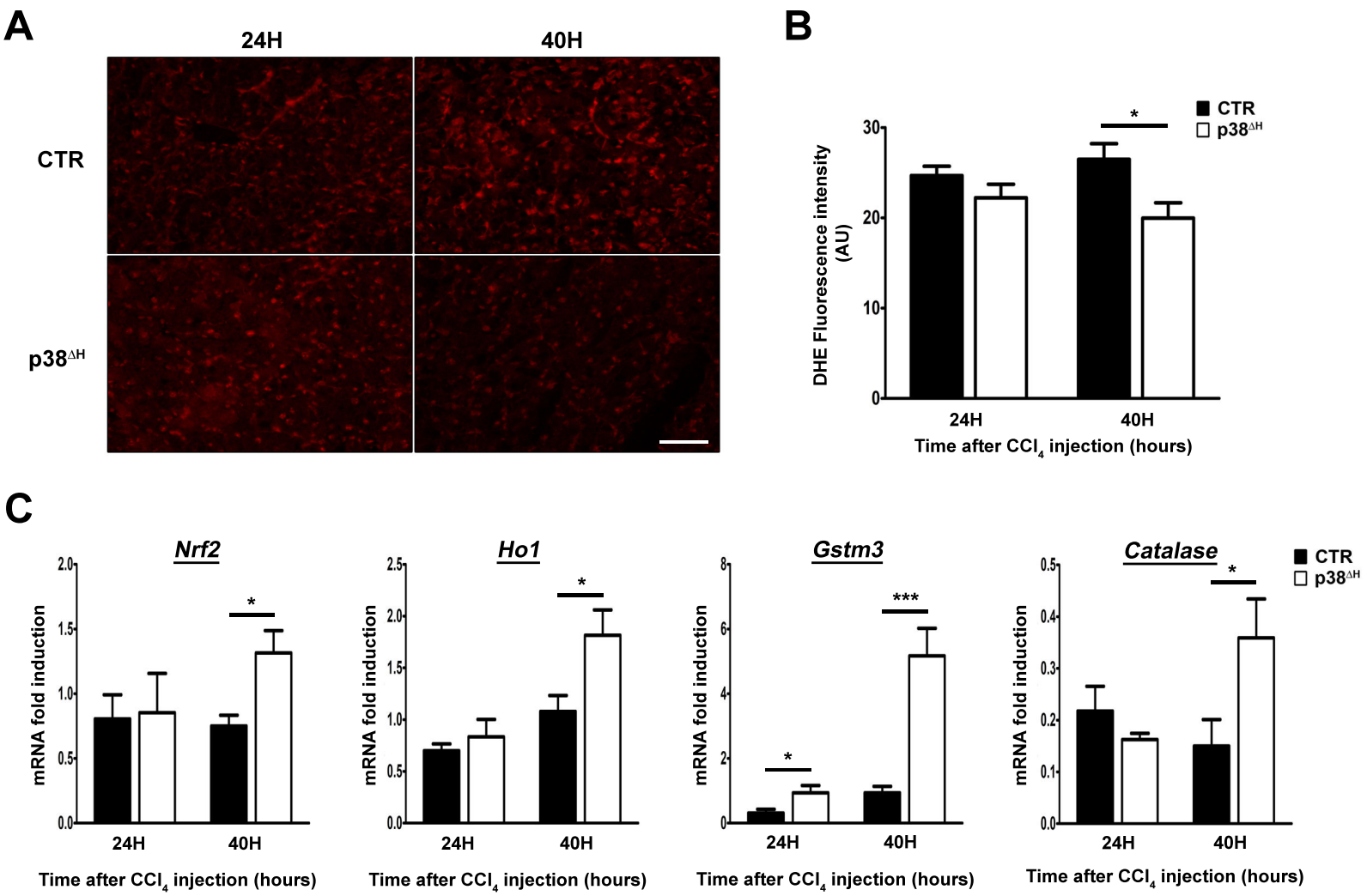

A
24H
40H
CTR
p38ΔH
B
CTR
p38ΔH
DHE Fluorescence intensity (AU)
Time after CCl4 injection (hours)
C
Nrf2
Ho1
Gstm3
Catalase
mRNA fold induction
Time after CCl4 injection (hours)

Figure 3

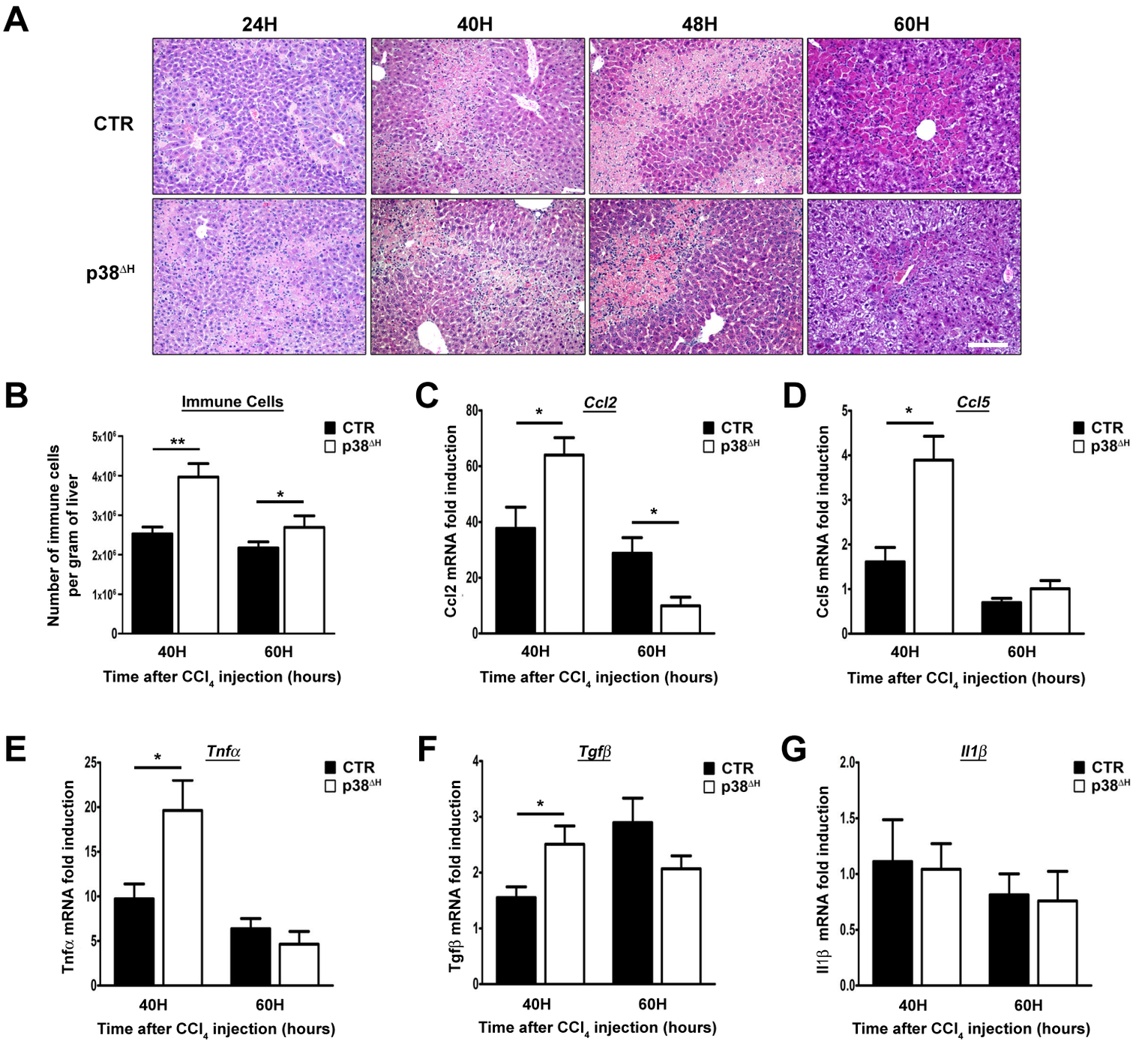

A
24H
40H
48H
60H
CTR
p38ΔH
B
Immune Cells
Number of immune cells per gram of liver
CTR
p38ΔH
40H
60H
Time after CCl4 injection (hours)
C
Ccl2
Ccl2 mRNA fold induction
D
Ccl5
Ccl5 mRNA fold induction
E
Tnfα
Tnfα mRNA fold induction
F
Tgfβ
Tgfβ mRNA fold induction
G
Il1β
Il1β mRNA fold induction

Figure 4

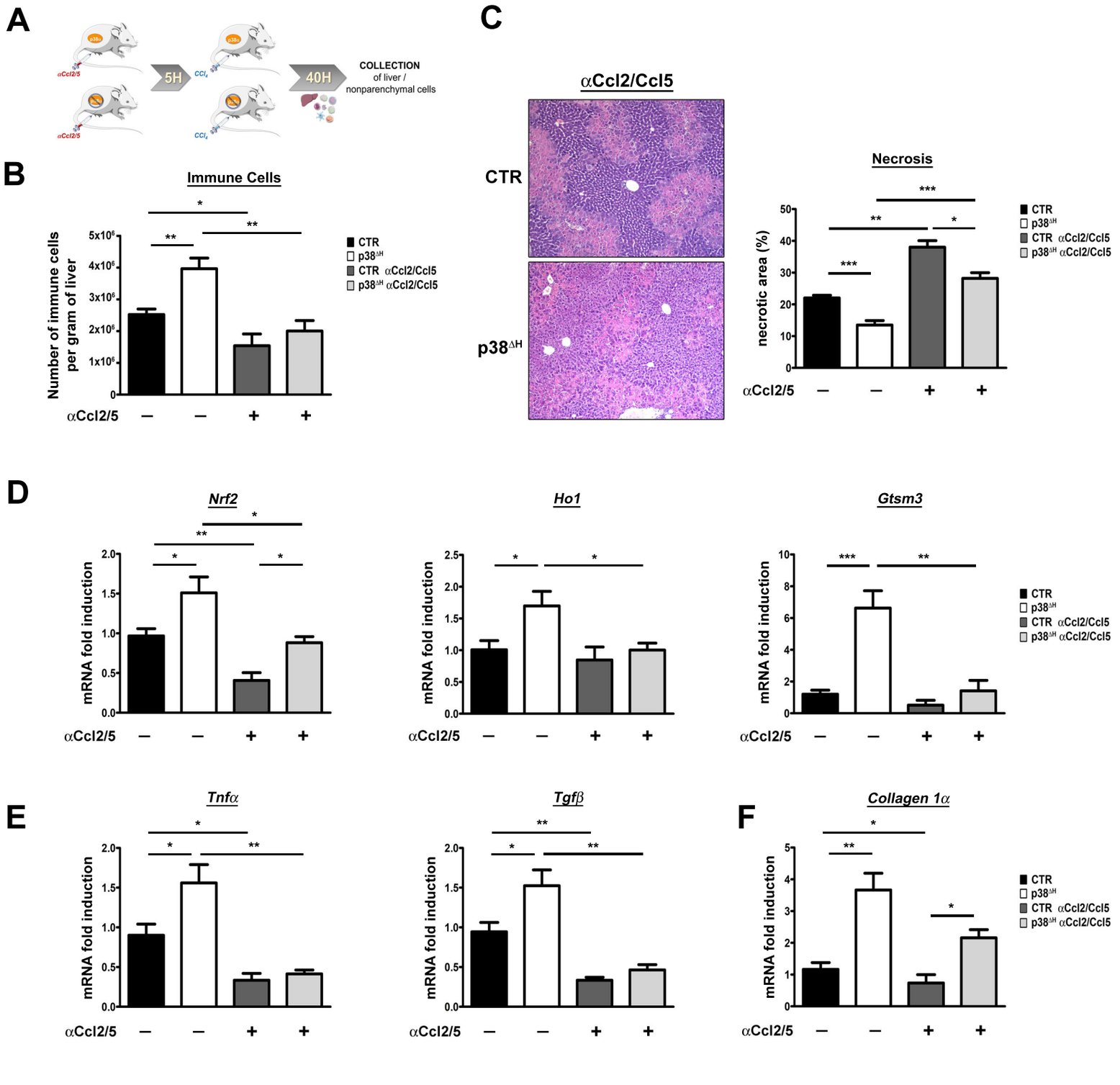

A
αCcl2/5
5H
CCl4
40H
COLLECTION
of liver /
nonparenchymal cells
B
Immune Cells
Number of immune cells per gram of liver
CTR
p38ΔH
CTR αCcl2/Ccl5
p38ΔH αCcl2/Ccl5
αCcl2/5
C
αCcl2/Ccl5
CTR
p38ΔH
Necrosis
necrotic area (%)
D
Nrf2
Ho1
Gtsm3
mRNA fold induction
E
Tnfα
Tgfβ
F
Collagen 1α

Figure 5

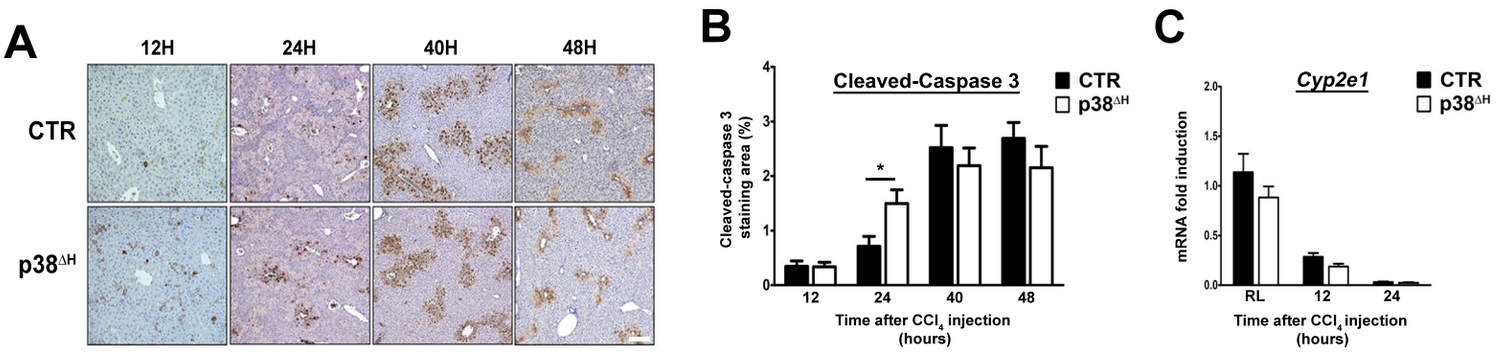


Figure Supplemental S1

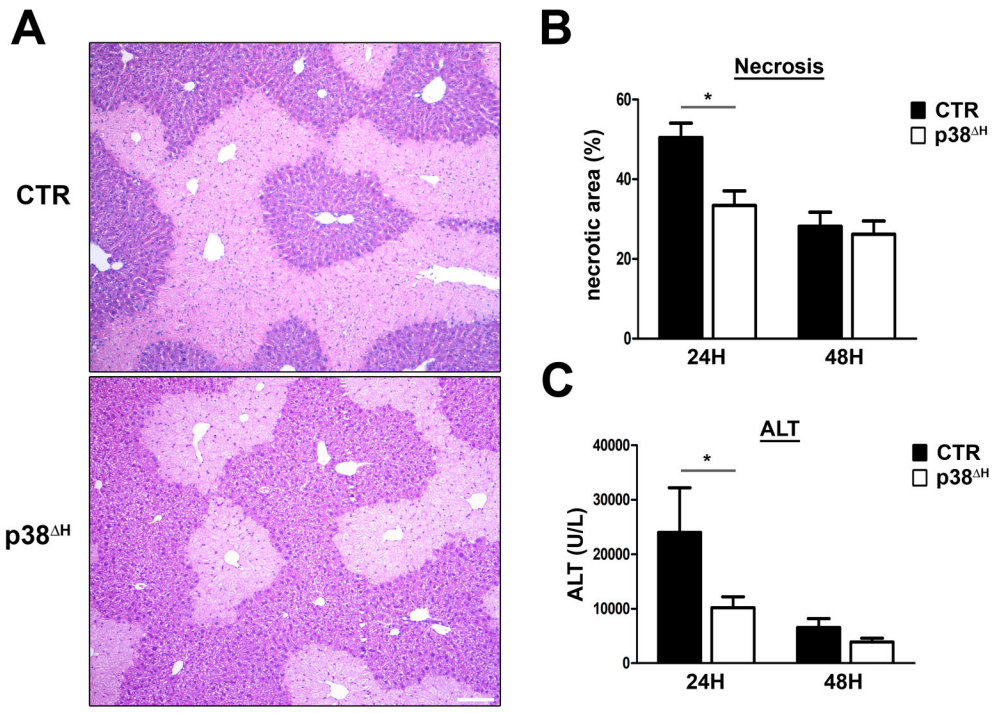


Figure Supplemental 2

Supplemental table 1. Primer Sequences

Gene	Forward	Reverse
18S	GTA-ACC-CGT-TGA-ACC-CCA-TT	CCA-TCC-AAT-CGG-TAG-TAG-CG
Catalase	ACA-TGG-TCT-GGG-ACT-TCT-GG	CAA-GTT-TTT-GAT-GCC-CTG-GT
Ccl2	TCT-GGG-CCT-GCT-GTT-CAC-A	GGA-TCA-TCT-TGC-TGG-TGA-ATG-A
Ccl5	GCT-GCT-TTG-CCT-ACC-TCT-CC	TCG-AGT-GAC-AAA-CAC-GAC-TGC
Collagen1α	GAG-CGG-AGA-GTA-CTG-GAT-CG	GCT-TCT-TTT-CCT-TGG-GGT-TC
Cyp2e1	CGT-TGC-CTT-GCT-TGT-CTG-GA	AAG-AAA-GGA-ATT-GGG-AAA-GGT-CC
Gstm3	TAT-GAC-ACT-GGG-CTA-TTG-GAA-CAC	GGG-CAT-CCC-CCA-TGA-CA
Ho1	AAG-CCC-AGA-ATG-CTG-AGT-TC	GCC-GTG-TAA-TAT-GGT-ACA-AGG-A
IL1β	GCC-CAT-CCT-CTG-TGA-CTC-AT	AGG-CCA-CAG-GTA-TTT-TGT-CG
Nrf2	AGG-ACA-TGG-AGC-AAG-TTT-GG	TCT-GTC-AGT-GTG-GCT-TCT-GG
Tgfβ1	TGG-CGT-TAC-CTT-GGT-AAC-C	GGT-GCT-GGG-CCC-TTT-CCA-G
Tnfα	CAT-CTT-CTC-AAA-ATT-CGA-GTG-ACA-A	TGG-GAG-TAG-ACA-AGG-TAC-ACC-CC

Supplemental Table 2. Antibodies used in this Study

Antibody	Dilution	Manufacter and Reference
Cyclin A2	1/2000	Abcam #32386
Cyclin B1	1/1000	Cell Signalling #4138
Cyclin D1	1/3000	Pierce MA1-39546
HSC70	1/25000	Santa Cruz #7298
p38α	1/4000	ThermoFisher Scientific #PA5-17713
phopho-p38	1/4000	Cell Signalling #4511

DISCUSSION

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, la place de la protéine p38 dans la physio-pathologie tissulaire est complexe : son activation et la réponse induite dépendent à la fois du signal (extra ou intra-cellulaire) reçu et du type cellulaire considéré (*Cuadrado and Nebreda, 2010; Keshet and Seger, 2010; Wagner and Nebreda, 2009*). Dans le foie, de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence un rôle phare de p38α notamment dans le contrôle de la prolifération hépatocytaire, l'apoptose ou bien la régulation du stress oxydant (*Hui et al., 2007b; Tormos et al., 2013b*). Cependant bon nombre de travaux sont basés sur l'utilisation de modèles murins où l'extinction génique de *p38α* est induite très tôt au cours du développement fœtal (stade hépatoblastes) ou bien néonatal (hépatocytes immatures) (*Hui et al., 2007a; Sakurai et al., 2008; Tormos et al., 2013a*). Au cours de ce travail de thèse, j'ai donc développé un modèle murin permettant d'étudier le rôle spécifique de p38α dans le foie adulte, avec une invalidation hépatospécifique de cette protéine dans les hépatocytes matures (souris p38α$^{\Delta H}$).

Deux axes de recherche ont ainsi été développés à l'aide de ce modèle murin :

(1) Le premier axe de mon travail de thèse a été consacré à la caractérisation de l'impact potentiel d'une levée du point de contrôle p38α sur la prolifération et la ploïdie des hépatocytes dans un foie adulte sain. Mes travaux ont montré, contre toute attente, que la perte d'expression de p38α n'induisait pas de modifications majeures de ces paramètres. Au cours de cette discussion, nous verrons que plusieurs hypothèses peuvent être émises afin de mieux comprendre ce phénotype.

(2) Dans un second temps, j'ai cherché à déterminer la fonction de p38α au cours d'une agression aiguë du foie. Mes travaux révèlent que, dans un contexte de stress hépatotoxique, la perte de p38α est protectrice pour le tissu hépatique et que cet effet hépatoprotecteur est notamment médié par une reprogrammation de la réponse immunitaire. Pour comprendre plus en détails ces résultats, nous discuterons les origines possibles de cette hépatoprotection, du point de vue de la mort cellulaire, la prolifération et de la réponse immunitaire.

Enfin, au vu des résultats obtenus au cours de cette thèse, nous aborderons la question de l'utilité de cibler thérapeutiquement p38α dans le foie.

1. p38α et contrôle du cycle cellulaire hépatocytaire dans un foie adulte sain

Les analyses immunohistochimiques *in situ*, complétées par l'étude moléculaire de régulateurs clés du cycle cellulaire en culture primaire n'a pas révélé de modification de la polyploïdie physiologique, ni d'altération de la prolifération des hépatocytes adultes dans le foie de notre modèle murin p38α$^{\Delta H}$ par rapport à des souris contrôles. Ces résultats étaient assez inattendus puisque jusqu'à présent une augmentation importante de la prolifération cellulaire constituait une caractéristique des cellules dépourvues d'expression de p38α (*Thornton and Rincon, 2009*). Mes travaux révèlent ainsi que la perte

de p38α dans les hépatocytes n'est pas suffisante pour faire passer le foie d'un état quiescent à un stade pro-prolifératif et par conséquent de moduler sa ploïdie, les deux étant intimement liés (*Gentric and Desdouets, 2014*). Nous ne pouvons pas exclure que la perte de p38α puisse être compensée par un autre facteur, qui prendrait alors le relais en tant que point de contrôle du cycle cellulaire. Quelques pistes nous permettent d'ailleurs d'avancer une participation active de la protéine p53 dans ce processus. En effet, outre une littérature riche d'exemples de coopération de ces deux protéines en tant que point de contrôle des phases G1/S ou G2/M du cycle cellulaire, des travaux récents du laboratoire auxquels j'ai participé, viennent conforter cette hypothèse (*Goloudina et al., 2016; Morandell et al., 2013; Stramucci et al., 2018; Vitale et al., 2008*). En effet, des premiers résultats *in vivo* ont ainsi montré que la perte d'expression de p38α et de p53 dans les hépatocytes matures (modèle murin p38α/p53$^{\Delta H}$, que j'ai établi), permet le passage d'un foie quiescent à un foie pro-prolifératif (augmentation du nombre d'hépatocytes marqués positivement par le Ki67) et est associée à une altération des ploïdies cellulaire (diminution du nombre d'hépatocytes binucléés) et nucléaire (émergence d'un contingent mononucléé hautement polyploïde). Toutefois, il est important de souligner que les modifications observées, tant sur la ploïdie que sur la prolifération hépatocytaire dans le foie de ces souris double KO, restent étonnamment modérées. Ces données suggèrent fortement une régulation plus complexe qui pourrait faire intervenir d'autres partenaires (autres points de contrôle et/ou actions du microenvironnement par exemple) et ouvrent de nouvelles perspectives d'investigation.

Mais quand est-il dans un système hautement prolifératif, tel que le modèle physiologique de l'hépatectomie partielle (HP) (*Gilgenkrantz and Collin de l'Hortet, 2018*) ? Les études précédentes, basées sur l'extinction précoce de p38α, ont montré que l'inactivation rapide de p38α suite à une HP permet l'initiation du cycle cellulaire hépatocytaire en passant le point de restriction en G1/S (*Campbell et al., 2011; Hui et al., 2007b*). Il serait donc intéressant de voir si dans notre modèle murin, la perte de p38α dans les hépatocytes adultes favorise et accroit de la même façon l'entrée en cycle des hépatocytes au cours de la régénération.

2. p38α et hépatoprotection au cours d'une agression aigüe du foie

Au cours de mes travaux de thèse sur le modèle d'hépatotoxicité aiguë induite par une injection unique de CCl_4 ou par une surcharge en paracétamol (APAP), nous avons mis en évidence un effet protecteur de la perte de p38α dans le tissu hépatique : diminution des plages de cytolyse corrélée à une réduction des niveaux sériques d'ALT dans le foie des souris p38α$^{\Delta H}$ par rapport aux foies de souris contrôles.
Comme nous l'avons largement évoqué précédemment, en réponse à une agression, l'activation de la MAPK p38α induit un large éventail de réponses cellulaires pour assurer le maintien de l'homéostasie

tissulaire. Une particularité du foie est sa formidable capacité à régénérer suite à une lésion tissulaire (induite par des composés toxiques, des médicaments ou bien une agression mécanique par exemple), grâce à une prolifération contrôlée des hépatocytes sains restants (*Michalopoulos, 2017*). Etant donné son rôle clé de régulateur négatif de la prolifération, nous nous attendions donc à observer dans le foie des souris p38α$^{\Delta H}$, une prolifération exacerbée des hépatocytes consécutivement à l'intoxication au CCl_4 (*Hui et al., 2007b; Stepniak et al., 2006; Thornton and Rincon, 2009*). Différemment, nos analyses indiquent une diminution globale du nombre d'hépatocytes en phase S et G2/M. Cette réponse proliférative semble néanmoins être en adéquation avec la minoration des dommages hépatiques générés par la perte d'expression de p38α, ne nécessitant donc pas une régénération compensatrice forte. Ainsi, ces résultats montrent que non seulement la perte d'expression de p38α n'altère pas la réponse proliférative des hépatocytes après l'exposition au CCl_4, mais révèlent surtout que la fonction de p38α en tant que point de contrôle du cycle cellulaire ne peut expliquer l'effet hépatoprotecteur observé. Au regard de la littérature, ces données sont nouvelles puisque jusqu'à présent une prolifération exacerbée était considérée comme une caractéristique intrinsèque majeure des cellules dépourvues de la protéine p38α.

Comment expliquer alors cet effet hépatoprotecteur ? Par une sensibilité différente des hépatocytes sans p38α face au composé cytotoxique, pouvant ainsi minorer les atteintes hépatiques initiales (*Mehendale, 2005*) ?

Concernant la sensibilité des hépatocytes face au CCl_4, nous montrons que sa métabolisation est effective et similaire dans le foie des souris contrôles et p38α$^{\Delta H}$ (diminution drastique des niveaux de transcrits C*yp2e1* 24 heures après l'exposition au CCl_4). Par ailleurs, à 24 heures (phase d'initiation des atteintes hépatiques), les niveaux sériques d'ALT et les plages de nécrose sont identiques dans les deux groupes de souris. Ces données témoignent du fait que la protéine p38α n'est pas impliquée dans la phase d'initiation des atteintes hépatiques et ne peut donc pas expliquer l'effet hépatoprotecteur observé.

De plus, nos travaux indiquent qu'une réponse apoptotique différentielle n'explique pas non plus la réduction des atteintes hépatiques. Cependant, l'apoptose n'étant pas la seule voie de mort cellulaire impliquée à la suite de la métabolisation du CCl_4, il serait donc nécessaire d'approfondir cet axe. Premièrement, il est primordial de déterminer l'importance du processus de nécrose dans le foie des souris contrôles et p38α$^{\Delta H}$ (*Sun et al., 2001*). En effet, cette dernière constituant une mort cellulaire moins contrôlée et moins « propre » que l'apoptose, nous pourrions émettre l'hypothèse que cette voie est favorisée, par rapport à l'apoptose, dans les souris contrôles, les dommages seraient alors plus étendus et le nettoyage des débris cellulaire plus lent (*Martin and Henry, 2013*). Deuxièmement, de nombreuses études ont mis en évidence un lien entre p38 et autophagie d'une part, et la fonction

protectrice de l'autophagie dans un contexte de toxicité induite par les médicaments d'autre part. Wu et collaborateurs ont ainsi montré que l'inhibition de l'autophagie accroit les dysfonctionnements mitochondriaux par augmentation des niveaux de ROS, aggravant la toxicité par nécrose (*Wu and Cederbaum, 2013*). Dans ce contexte, p38 est activée et, de manière intéressante, son inhibition pharmacologique permet de diminuer les dommages hépatiques. L'autophagie a également été décrite comme un mécanisme d'autodéfense dans le cas d'un dysfonctionnement hépatique induit par un médicament anticancéreux (*Yang et al., 2015*). L'activation de p38 est corrélée à l'induction de l'autophagie, laissant supposer un rôle de gardien contre l'hépatotoxicité induite par le médicament. D'autre part, il est intéressant de souligner qu'une surexpression de p62/SQSTM1, protéine clé dans les processus d'autophagie, est observée en réponse à une activation du facteur antioxydant NRF2 (*Jain et al., 2010*). Or, nous montrons dans notre modèle murin une augmentation significative des transcrits de *Nrf2* et de ses substrats 40 heures après l'exposition au CCl_4, témoignant d'une réponse antioxydante forte participant à l'hépatoprotection. Il apparait donc essentiel d'analyser la contribution de cette autre voie de mort cellulaire dans notre modèle, d'autant plus que le stress oxydant est un facteur commun à l'activation de l'autophagie et de p38 (*Peña-Oyarzun et al., 2018; Tormos et al., 2013b*).

Enfin, pour compléter cette étude, nous pouvons envisager de tester directement en culture primaire, et donc indépendamment du microenvironnement hépatique, la sensibilité des hépatocytes dépourvus de p38α isolés face à des signaux de mort comme le LPS, anticorps agoniste de Fas/CD95, ou encore l'association du TNFα avec l'actinomycine D.

Afin de compenser la mort cellulaire, des mécanismes de survie se mettent en place et la réparation tissulaire est largement dépendante de l'équilibre de cette balance. Une des voies essentielles dans la survie cellulaire est la voie NF-κB (*Perkins, 2007*). Il y a une dizaine d'années maintenant, l'équipe de Pasparakis a reporté une action conjointe de la protéine p38α et IKK2, impliquée dans l'activation de la voie NF-κB, pour protéger le foie contre la toxicité induite par le LPS (*Heinrichsdorff et al., 2008*) En effet, les dommages hépatiques engendrés par le LPS sont aggravés lorsque p38α est conjointement inhibée avec IKK2 dans les hépatocytes (inhibition partielle de la voie NF-κB), ceci passant par une hyperactivation de la kinase JNK. Il serait donc intéressant de compléter nos travaux et d'analyser le statut d'activation de la voie NF-κB dans notre modèle.

3. p38α et réponse immunitaire

Mon travail de thèse a par ailleurs permis de montrer une interaction forte de p38α avec le microenvironnement immunitaire, lors d'une agression hépatique aiguë. En effet, la délétion hépato-spécifique de p38α dans les hépatocytes matures a de fortes répercussions sur le microenvironnement

immunitaire (recrutement massif de cellules immunitaires $CD45^+$) et permet ainsi de fournir une réponse hépatoprotectrice efficace, favorisant la réparation tissulaire. Par ailleurs, nous avons identifié les chimiokines CCL2 et CCL5, dont les niveaux d'expressions sont largement augmentés dans le foie des souris $p38\alpha^{\Delta H}$ après l'exposition au CCl_4, comme des acteurs cruciaux dans la mise en œuvre de cette réponse bénéfique. Ainsi, leur blocage (utilisation d'anticorps pour neutraliser leur action) se traduit par une diminution du recrutement des cellules immunitaires, une aggravation des atteintes hépatiques dans le foie des souris $p38\alpha^{\Delta H}$ et un amoindrissement de la réparation tissulaire (diminution des transcrits du *Collagène 1α* à 40 heures post injection d'anticorps anti-CCL2/CCL5). Ces résultats importants sont novateurs et illustrent une nouvelle fonction de p38α dans les hépatocytes en réponse à une agression hépatique. En effet, jusqu'à présent, seule la perte d'expression de p38α dans des cellules immunitaires de type myéloïdes ou les cellules T et NKT avait été rapportée comme bénéfique pour le tissu hépatique (*Kang et al., 2015; Liu et al., 2017b*).

Les travaux de Kang et collaborateurs soulignent que la perte d'expression de p38α, cette fois-ci dans les hépatocytes, est corrélée à une aggravation des atteintes hépatiques et à un recrutement massif de cellules inflammatoires. Ces données sont quelque peu surprenantes au regard de nos travaux, mais peuvent s'expliquer par l'utilisation d'un modèle murin d'agression hépatique différent pour cette étude (modèle de la Concanavaline A, ConA) (*Kang et al., 2015*). L'ensemble de ces observations révèlent ainsi l'importance de la nature de l'agression, qui, en ne faisant pas intervenir les mêmes effecteurs immunitaires (cellules myéloïdes dans les modèles CCl_4 et APAP et le réservoir des lymphocytes T dans le modèle ConA) influence la réponse cellulaire induite par la protéine p38α et la réparation tissulaire consécutive (*Khan et al., 2017*). Enfin, il est intéressant de souligner que la diminution de la réponse antioxydante observée dans le foie des souris $p38\alpha^{\Delta H}$ après le blocage de CCL2/CCL5 suggère par ailleurs un dialogue étroit entre p38α et le système immunitaire afin de réguler la balance redox au cours d'une agression du foie.

La suite de ce travail est donc de définir maintenant quelle est ou quelles sont les populations immunitaires pouvant médier cet effet hépatoprotecteur dans le foie des souris $p38\alpha^{\Delta H}$.

Lors d'une agression aiguë du foie, en plus d'une activation des macrophages résidents, un afflux massif de monocytes infiltrants de la moelle osseuse vers le site lésé est observé, et l'ensemble de ces cellules participent à la réparation tissulaire et à la résolution de la réponse inflammatoire (*Brempelis and Crispe, 2016; Wynn and Vannella, 2016; Zimmermann et al., 2012*).

Nous avons déjà initié quelques expériences et les prémices de ce travail montrent une diminution du nombre de monocytes inflammatoires $F4/80^+$ $CD11b^+$ dans les foies de souris $p38\alpha^{\Delta H}$ par rapport aux foies contrôles, que ce soit à 40 ou 60 heures post-CCl_4 (**Figure 31A**). Par ailleurs, nous avons isolé ces cellules et l'analyse de l'expression de quelques marqueurs de polarisation (M1/M2) ne nous permet

pas d'établir pour l'instant un profil tranché pour ces macrophages / monocytes dans le foie de souris p38α$^{\Delta H}$. Cependant nos observations semblent tout de même montrer une polarisation différente par rapport aux souris contrôles, principalement en fin de cinétique (60 heures post-CCl_4) (**Figures 31B et 31C**). Cet axe nécessite cependant d'être approfondi. De plus, l'absence de modifications de la polarisation à 40 heures post-CCl_4 entre les deux groupes de souris, nous pousse à émettre l'hypothèse que s'il doit y avoir une modification, cette dernière se fait bien avant ce timing et ce point donnera lieu à des investigations supplémentaires.

Au vu de ces résultats un peu étonnants compte tenu de la littérature, nous avons émis l'hypothèse que d'autres populations devaient participer à la réparation tissulaire et permettre ainsi de limiter les lésions induites par le CCl_4 en absence de p38α. Parmi elles, les cellules NK sont également décrites pour avoir des propriétés de nettoyage et de clairance du tissu, facilitant ainsi la régénération tissulaire (*Shi et al., 2011; Tosello-Trampont et al., 2017*). Des travaux ont montré un rôle important de l'IL-22 (produite notamment par les cellules NK) dans la réponse hépatoprotectrice lors des agressions aiguës du foie et la régénération hépatique (*Kudira et al., 2016; Radaeva et al., 2004; Zenewicz et al., 2007*). De manière intéressante, nos résultats indiquent un enrichissement du nombre de cellules $CD3^-$ $NK1.1^+$ dans les foies de souris p38α$^{\Delta H}$ comparés aux foies contrôles, à 40 et 60 heures post-CCl_4 et nous conforte donc dans l'idée que cette population pourrait participer activement à l'effet hépatoprotecteur (**Figure 31D**). L'analyse de marqueurs, tels que l'IL-18 ou NKG2D, pourrait nous permettre de mettre en lumière une éventuelle différence d'activation et de cytotoxicité des NK dans notre modèle murin. De plus, pour évaluer le rôle potentiel des populations NK dans notre phénotype, nous pouvons envisager de dépléter cette population (par un anticorps anti-Asialo GM1) dans notre modèle murin et étudier l'évolution des atteintes hépatiques après l'exposition au CCl_4 dans ces conditions.

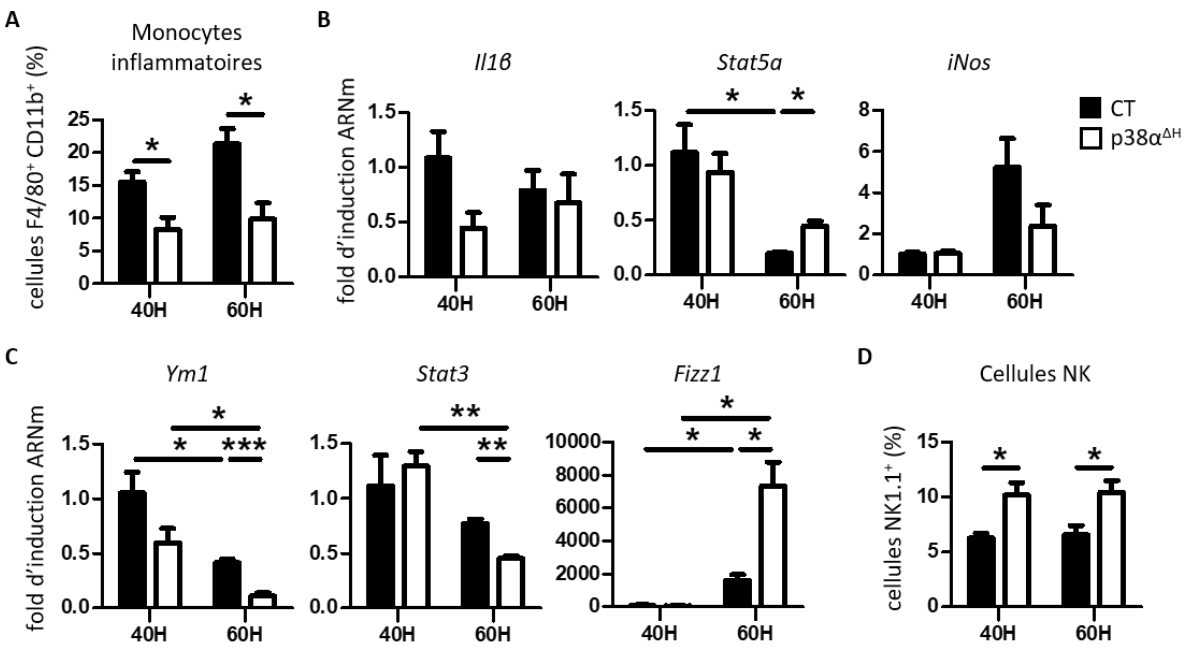


Figure 31. Les monocytes inflammatoires et les cellules NK sont modifiés dans le foie des souris p38α$^{\Delta H}$.

A. Proportion des monocytes inflammatoires F4/80$^+$ CD11b$^+$ parmi les CD11c$^-$ dans les foies de souris CT (noir) et p38α$^{\Delta H}$ (blanc) à 40H et 60H post-CCl_4. (N≥3 par groupe, *p<0.05).

B. Analyse de l'expression des gènes associés au type M1 dans les monocytes inflammatoires isolés à partir des foies de souris CT (noir) et p38α$^{\Delta H}$ (blanc), à 40H et 60H post-CCl_4, par RT-qPCR. (N≥3 par groupe, *p<0.05).

C. Analyse de l'expression des gènes associés au type M2 dans les monocytes inflammatoires isolés à partir des foies de souris CT (noir) et p38α$^{\Delta H}$ (blanc), à 40H et 60H post-CCl_4, par RT-qPCR. (N≥3 par groupe, *p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001).

D. Proportion des cellules NK NK1.1$^+$ parmi les CD11c$^-$ dans les foies de souris CT (noir) et p38α$^{\Delta H}$ (blanc) à 40H et 60H post-CCl_4. (N≥3 par groupe, *p<0.05).

Néanmoins, des questions subsistent : comment se fait la communication entre l'hépatocyte dépourvu de p38α et le système immunitaire pour médier cet effet hépatoprotecteur ? Peut-on alors imaginer une communication paracrine entre l'hépatocyte et les cellules immunitaires ? Quelques travaux montrent que l'hépatocyte lésé est lui-même capable de produire et de relarguer du CCL2 favorisant ainsi la réponse immunitaire lors d'agressions du foie (*Dambach et al., 2002; Na et al., 2015; Xie et al., 2016*). Nous pourrions tester ce potentiel effet paracrine et identifier les marqueurs sécrétés par l'hépatocyte dépourvu de p38α par des co-cultures de ces derniers avec la ou les populations immunitaires que nous aurons identifiées par les approches expérimentales évoquées précedemment, après une exposition au CCl_4 par exemple. Enfin, il est possible d'imaginer que l'hépatocyte déficient en p38α exprime à sa surface une molécule spécifiquement reconnue par une catégorie de cellules immunitaires. Comme nous pouvons le constater, la compréhension du dialogue entre l'hépatocyte et le système immunitaire dans notre modèle murin p38α$^{\Delta H}$ nous ouvre un large champ d'investigations futures.

4. p38 et thérapeutique

p38 apparait de plus en plus comme une cible thérapeutique prometteuse. Cependant, son rôle pléiotropique ainsi que son implication dans de multiples voies de signalisation entrainent des difficultés dans la mise en place d'une réponse efficace, notamment par l'émergence de nombreux effets secondaires indésirables. En effet, diverses études ont reporté une forte toxicité (hépatique, neurale, infections opportunistes par exemple) lors de l'utilisation des inhibiteurs de première génération de p38, BIRB796 ou SB203580, notamment due à un emballement de la réponse pro-inflammatoire (*Dominguez et al., 2005; Singh et al., 2018*). Les travaux actuels se focalisent davantage sur les acteurs moléculaires en amont (MKK3 et 6) et en aval (Atf2, MK2) afin de contourner les effets toxiques (*Adams et al., 2016; Singh et al., 2018*). De plus, le développement de nouveaux inhibiteurs de p38, qu'ils soient allostériques ou catalytiques, est basé sur leur association aux thérapies déjà existantes. En cherchant à comprendre les mécanismes sous-jacents de la résistance au sorafenib (un inhibiteur multikinasique) dans le CHC, Rudalska et collaborateurs ont ainsi montré qu'une inhibition de p38 par shRNA ou de façon pharmacologique permet de restaurer la sensibilité à ce traitement, réduisant ainsi la prolifération cellulaire (*Rudalska et al., 2014*). Le statut mutationnel de p53 semble également être déterminant dans l'efficacité d'un inhibiteur de p38, d'autant plus que cette signalisation p38-p53 participe activement à la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire (*Stramucci et al., 2018*). Les recherches se concentrent donc aussi sur le développement de molécules permettant de restaurer l'activité de p53 (*Perdrix et al., 2017*). Finalement, l'objectif principal est de développer des thérapies personnalisées afin d'éviter une dérive vers une résistance au traitement et donc d'aggraver la maladie (*García-Cano et al., 2016*).

Notre étude démontre pour la première fois que l'inhibition de p38α dans les hépatocytes est protectrice dans un contexte d'agression aiguë du foie adulte, en agissant non seulement sur le recrutement de cellules immunitaires mais aussi en apportant une protection contre les ROS par une réponse antioxydante exacerbée. Le traitement des ALIs chez l'homme est compliqué et se trouve souvent limité par le temps de prise en charge des patients après l'intoxication, la transplantation hépatique devenant alors la seule option thérapeutique proposée. Dans le cas des intoxications au paracétamol, seule une prise massive d'antioxydants (NAC) dans les 8 heures après la prise en charge de ce dernier permet une détoxifications des métabolites toxiques NAPQI et empêche alors l'initiation des atteintes hépatiques (*Du et al., 2016*). Compte-tenu de nos résultats, il est tentant de spéculer que l'inhibition de l'expression de p38α associée par exemple à une prise de NAC pourrait potentialiser les effets bénéfiques de cette dernière et permettre une meilleure réparation tissulaire. Néanmoins, il est nécessaire de garder à l'esprit que le rôle de p38 est dépendant du contexte cellulaire. Les stratégies

développées devraient donc intégrer de cibler précisément un type cellulaire en fonction de l'effet désiré.

En conclusion, ce travail de thèse démontre que la MAPK p38α est un régulateur important de la réponse hépatocytaire lors d'une agression aiguë du foie. De manière originale, sa déficience protège le tissu hépatique des lésions générées, grâce à des signaux chimiotactiques fondamentaux, CCL2 et CCL5, favorisant une réparation précoce et le maintien de l'homéostasie hépatique. Les études futures conduiront à identifier les populations immunitaires mises en jeu dans ces processus et nous permettront de mieux comprendre le dialogue entre hépatocytes et cellules inflammatoires au cours d'une agression aiguë du foie. Enfin, ces travaux permettent d'envisager de nouvelles approches de traitement des ALIs, lors desquelles cibler p38 de manière cellule-spécifique pourrait fournir une stratégie de protection contre l'hépatotoxicité.

BIBLIOGRAPHIE

• A •

Abdel-Misih, S.R.Z., and Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. Surg. Clin. North Am. *90*, 643–653.

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

Adams, D.H., Sanchez-Fueyo, A., and Samuel, D. (2015). From immunosuppression to tolerance. J. Hepatol. *62*, S170-185.

Adams, M., Kobayashi, T., Lawson, J.D., Saitoh, M., Shimokawa, K., Bigi, S.V., Hixon, M.S., Smith, C.R., Tatamiya, T., Goto, M., et al. (2016). Fragment-based drug discovery of potent and selective MKK3/6 inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. *26*, 1086–1089.

Adams, R.H., Porras, A., Alonso, G., Jones, M., Vintersten, K., Panelli, S., Valladares, A., Perez, L., Klein, R., and Nebreda, A.R. (2000). Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. Mol. Cell *6*, 109–116.

Alfert, M., and Geschwind, I.I. (1958). The development of polysomaty in rat liver. Exp. Cell Res. *15*, 230–232.

Alonso, G., Ambrosino, C., Jones, M., and Nebreda, A.R. (2000). Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength. J. Biol. Chem. *275*, 40641–40648.

Anatskaya, O.V., and Vinogradov, A.E. (2007). Genome multiplication as adaptation to tissue survival: evidence from gene expression in mammalian heart and liver. Genomics *89*, 70–80.

Andrews, D.M., Scalzo, A.A., Yokoyama, W.M., Smyth, M.J., and Degli-Esposti, M.A. (2003). Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. Nat. Immunol. *4*, 175–181.

Apte, U., Gkretsi, V., Bowen, W.C., Mars, W.M., Luo, J.-H., Donthamsetty, S., Orr, A., Monga, S.P.S., Wu, C., and Michalopoulos, G.K. (2009). Enhanced liver regeneration following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase. Hepatol. Baltim. Md *50*, 844–851.

Arshad, M.I., Piquet-Pellorce, C., Filliol, A., L'Helgoualc'h, A., Lucas-Clerc, C., Jouan-Lanhouet, S., Dimanche-Boitrel, M.-T., and Samson, M. (2015). The chemical inhibitors of cellular death, PJ34 and Necrostatin-1, down-regulate IL-33 expression in liver. J. Mol. Med. Berl. Ger. *93*, 867–878.

Awad, M.M., Enslen, H., Boylan, J.M., Davis, R.J., and Gruppuso, P.A. (2000). Growth regulation via p38 mitogen-activated protein kinase in developing liver. J Biol Chem *275*, 38716–38721.

• B •

Bandyopadhyay, K., Marrero, I., and Kumar, V. (2016). NKT cell subsets as key participants in liver physiology and pathology. Cell. Mol. Immunol. *13*, 337–346.

Bantel, H., and Schulze-Osthoff, K. (2012). Mechanisms of cell death in acute liver failure. Front. Physiol. *3*, 79.

Barajas-Espinosa, A., Basye, A., Jesse, E., Yan, H., Quan, D., and Chen, C.-A. (2014). Redox activation of DUSP4 by N-acetylcysteine protects endothelial cells from Cd^{2+}-induced apoptosis. Free Radic. Biol. Med. *74*, 188–199.

Barajas-Espinosa, A., Basye, A., Angelos, M.G., and Chen, C.-A. (2015). Modulation of p38 kinase by DUSP4 is important in regulating cardiovascular function under oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. *89*, 170–181.

Bardwell, A.J., Frankson, E., and Bardwell, L. (2009). Selectivity of docking sites in MAPK kinases. J. Biol. Chem. *284*, 13165–13173.

Barnouin, K., Dubuisson, M.L., Child, E.S., Fernandez de Mattos, S., Glassford, J., Medema, R.H., Mann, D.J., and Lam, E.W.-F. (2002). H2O2 induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. J. Biol. Chem. *277*, 13761–13770.

Beardmore, V.A., Hinton, H.J., Eftychi, C., Apostolaki, M., Armaka, M., Darragh, J., McIlrath, J., Carr, J.M., Armit, L.J., Clacher, C., et al. (2005). Generation and characterization of p38beta (MAPK11) gene-targeted mice. Mol. Cell. Biol. *25*, 10454–10464.

Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C., et al. (2006). Apc tumor suppressor gene is the “zonation-keeper” of mouse liver. Dev Cell *10*, 759–770.

Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H.F., and Marshall, C.J. (1998). Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. Curr. Biol. CB *8*, 1049–1057.

Birchmeier, W. (2016). Orchestrating Wnt signalling for metabolic liver zonation. Nat. Cell Biol. *18*, 463–465.

Blouin, A., Bolender, R.P., and Weibel, E.R. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. J. Cell Biol. *72*, 441–455.

Bogdanos, D.P., Gao, B., and Gershwin, M.E. (2013). Liver immunology. Compr. Physiol. *3*, 567–598.

Bokemeyer, D., Lindemann, M., and Kramer, H.J. (1998). Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in vascular smooth muscle cells. Hypertens. Dallas Tex 1979 *32*, 661–667.

Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., and Yancopoulos, G.D. (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. Cell *65*, 663–675.

Boyer, J.L. (2013). Bile formation and secretion. Compr. Physiol. *3*, 1035–1078.

Bradham, C.A., Plümpe, J., Manns, M.P., Brenner, D.A., and Trautwein, C. (1998). Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. Am. J. Physiol. *275*, G387-392.

Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J.-J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2003). Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. Genes Dev. *17*, 1969–1978.

Brempelis, K.J., and Crispe, I.N. (2016). Infiltrating monocytes in liver injury and repair. Clin. Transl. Immunol. *5*, e113.

Brodsky, W.Y., and Uryvaeva, I.V. (1977). Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. Int Rev Cytol *50*, 275–332.

Bruzzì, S., Sutti, S., Giudici, G., Burlone, M.E., Ramavath, N.N., Toscani, A., Bozzola, C., Schneider, P., Morello, E., Parola, M., et al. (2018). B2-Lymphocyte responses to oxidative stress-derived antigens contribute to the evolution of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Free Radic. Biol. Med. *124*, 249–259.

Bulavin, D.V., Higashimoto, Y., Popoff, I.J., Gaarde, W.A., Basrur, V., Potapova, O., Appella, E., and Fornace, A.J. (2001). Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. Nature *411*, 102–107.

Bulavin, D.V., Amundson, S.A., and Fornace, A.J. (2002). p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony. Curr. Opin. Genet. Dev. *12*, 92–97.

Bulavin, D.V., Phillips, C., Nannenga, B., Timofeev, O., Donehower, L.A., Anderson, C.W., Appella, E., and Fornace, A.J. (2004). Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. Nat. Genet. *36*, 343–350.

• C •

Cabrera, R., Tu, Z., Xu, Y., Firpi, R.J., Rosen, H.R., Liu, C., and Nelson, D.R. (2004). An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. Hepatol. Baltim. Md *40*, 1062–1071.

Cai, Y., Gong, L., Qi, X., Li, X., and Ren, J. (2005). Apoptosis initiated by carbon tetrachloride in mitochondria of rat primary cultured hepatocytes. Acta Pharmacol. Sin. *26*, 969–975.

Campbell, J.S., Argast, G.M., Yuen, S.Y., Hayes, B., and Fausto, N. (2011). Inactivation of p38 MAPK during liver regeneration. Int. J. Biochem. Cell Biol. *43*, 180–188.

Carriere, R. (1969). The growth of liver-parenchymal nuclei and its endocrine regulation. Inter Rev Cytol. *25*, 201–278.

Casanovas, O., Miró, F., Estanyol, J.M., Itarte, E., Agell, N., and Bachs, O. (2000). Osmotic stress regulates the stability of cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent manner. J. Biol. Chem. *275*, 35091–35097.

Celton-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D., Margall-Ducos, G., and Desdouets, C. (2009). The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. J Clin Invest *119*, 1880–1887.

Chang, N.C., Sincennes, M.-C., Chevalier, F.P., Brun, C.E., Lacaria, M., Segalés, J., Muñoz-Cánoves, P., Ming, H., and Rudnicki, M.A. (2018). The Dystrophin Glycoprotein Complex Regulates the Epigenetic Activation of Muscle Stem Cell Commitment. Cell Stem Cell *22*, 755-768.e6.

Chang, W.-W., Su, I.-J., Chang, W.-T., Huang, W., and Lei, H.-Y. (2008). Suppression of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits hepatitis B virus replication in human hepatoma cell: the antiviral role of nitric oxide. J. Viral Hepat. *15*, 490–497.

Chen, J., Zhang, B., Wong, N., Lo, A.W.I., To, K.-F., Chan, A.W.H., Ng, M.H.L., Ho, C.Y.S., Cheng, S.-H., Lai, P.B.S., et al. (2011). Sirtuin 1 is upregulated in a subset of hepatocellular carcinomas where it is essential for telomere maintenance and tumor cell growth. Cancer Res. *71*, 4138–4149.

Cherrington, A.D., Edgerton, D., and Sindelar, D.K. (1998). The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. Diabetologia *41*, 987–996.

Cheung, W.D., and Hart, G.W. (2008). AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation. J. Biol. Chem. *283*, 13009–13020.

Cheung, P.C.F., Campbell, D.G., Nebreda, A.R., and Cohen, P. (2003). Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. EMBO J. *22*, 5793–5805.

Collins, Q.F., Xiong, Y., Lupo, E.G., Liu, H.-Y., and Cao, W. (2006). p38 Mitogen-activated protein kinase mediates free fatty acid-induced gluconeogenesis in hepatocytes. J. Biol. Chem. *281*, 24336–24344.

Couinaud, C., Delmas, A., and Patel, J. (1957). C. Couinaud,... Le Foie : études anatomiques et chirurgicales. Préfaces des Prof. A. André Delmas et J. Jean Patel.

Cressman, D.E., Diamond, R.H., and Taub, R. (1995). Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. Hepatol. Baltim. Md *21*, 1443–1449.

Cressman, D.E., Greenbaum, L.E., DeAngelis, R.A., Ciliberto, G., Furth, E.E., Poli, V., and Taub, R. (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. Science *274*, 1379–1383.

Crispe, I.N. (2011). Liver antigen-presenting cells. J. Hepatol. *54*, 357–365.

Crispe, I.N., Giannandrea, M., Klein, I., John, B., Sampson, B., and Wuensch, S. (2006). Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance. Immunol. Rev. *213*, 101–118.

Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. Biochem. J. *429*, 403–417.

Cuenda, A., and Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Biochim Biophys Acta *1773*, 1358–1375.

• D •

Dambach, D.M., Watson, L.M., Gray, K.R., Durham, S.K., and Laskin, D.L. (2002). Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. Hepatol. Baltim. Md *35*, 1093–1103.

Dara, L., Johnson, H., Suda, J., Win, S., Gaarde, W., Han, D., and Kaplowitz, N. (2015). Receptor interacting protein kinase 1 mediates murine acetaminophen toxicity independent of the necrosome and not through necroptosis. Hepatol. Baltim. Md *62*, 1847–1857.

Dara, L., Liu, Z.-X., and Kaplowitz, N. (2016). Questions and controversies: the role of necroptosis in liver disease. Cell Death Discov. *2*, 16089.

Davoli, T., and de Lange, T. (2011). The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. Annu Rev Cell Dev Biol *27*, 585–610.

Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M., and Alessi, D.R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. EMBO J. *17*, 4426–4441.

Delahunty, T.J., and Rubinstein, D. (1970). Accumulation and release of triglycerides by rat liver following partial hepatectomy. J. Lipid Res. *11*, 536–543.

Deutsch, M., Graffeo, C.S., Rokosh, R., Pansari, M., Ochi, A., Levie, E.M., Van Heerden, E., Tippens, D.M., Greco, S., Barilla, R., et al. (2015). Divergent effects of RIP1 or RIP3 blockade in murine models of acute liver injury. Cell Death Dis. *6*, e1759.

Dixon, L.J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M.T., and Nagy, L.E. (2013). Kupffer cells in the liver. Compr. Physiol. *3*, 785–797.

Dominguez, C., Powers, D.A., and Tamayo, N. (2005). p38 MAP kinase inhibitors: many are made, but few are chosen. Curr. Opin. Drug Discov. Devel. *8*, 421–430.

Dozier, C., Mazzolini, L., Cénac, C., Froment, C., Burlet-Schiltz, O., Besson, A., and Manenti, S. (2017). CyclinD-CDK4/6 complexes phosphorylate CDC25A and regulate its stability. Oncogene *36*, 3781–3788.

Du, K., Ramachandran, A., and Jaeschke, H. (2016). Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. Redox Biol. *10*, 148–156.

Duncan, A.W., Taylor, M.H., Hickey, R.D., Hanlon Newell, A.E., Lenzi, M.L., Olson, S.B., Finegold, M.J., and Grompe, M. (2010). The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. Nature *467*, 707–710.

• E •

Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J.-P., Rath, M., and Wagner, E.F. (2003). Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. Cell *112*, 181–192.

• F •

Faggioli, F., Palagano, E., Di Tommaso, L., Donadon, M., Marrella, V., Recordati, C., Mantero, S., Villa, A., Vezzoni, P., and Cassani, B. (2018). B lymphocytes limit senescence-driven fibrosis resolution and favor hepatocarcinogenesis in mouse liver injury. Hepatol. Baltim. Md *67*, 1970–1985.

Faubion, W.A., and Gores, G.J. (1999). Death receptors in liver biology and pathobiology. Hepatol. Baltim. Md *29*, 1–4.

Fausto, N., Campbell, J.S., and Riehle, K.J. (2006). Liver regeneration. Hepatology *43*, S45-53.

Ferrari, D., Stepczynska, A., Los, M., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. (1998). Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. J. Exp. Med. *188*, 979–984.

Filliol, A., Piquet-Pellorce, C., Le Seyec, J., Farooq, M., Genet, V., Lucas-Clerc, C., Bertin, J., Gough, P.J., Dimanche-Boitrel, M.-T., Vandenabeele, P., et al. (2016). RIPK1 protects from TNF-α-mediated liver damage during hepatitis. Cell Death Dis. *7*, e2462.

Fortier, M., Celton-Morizur, S., and Desdouets, C. (2017). Incomplete cytokinesis/binucleation in mammals: The powerful system of hepatocytes. Methods Cell Biol. *137*, 119–142.

Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., and Saklatvala, J. (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. Cell *78*, 1039–1049.

• G •

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ. *25*, 486–541.

Ganem, N.J., and Pellman, D. (2007). Limiting the proliferation of polyploid cells. Cell *131*, 437–440.

Ganem, N.J., Cornils, H., Chiu, S.Y., O'Rourke, K.P., Arnaud, J., Yimlamai, D., Thery, M., Camargo, F.D., and Pellman, D. (2014). Cytokinesis failure triggers hippo tumor suppressor pathway activation. Cell *158*, 833–848.

Gao, B., Jeong, W.-I., and Tian, Z. (2008). Liver: An organ with predominant innate immunity. Hepatol. Baltim. Md *47*, 729–736.

García-Cano, J., Roche, O., Cimas, F.J., Pascual-Serra, R., Ortega-Muelas, M., Fernández-Aroca, D.M., and Sánchez-Prieto, R. (2016). p38MAPK and Chemotherapy: We Always Need to Hear Both Sides of the Story. Front. Cell Dev. Biol. *4*, 69.

Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R.J., Luo, Y., and Han, J. (2002). MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. Science *295*, 1291–1294.

Gebhardt, R., and Matz-Soja, M. (2014). Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. World J. Gastroenterol. *20*, 8491–8504.

Gentric, G., and Desdouets, C. (2014). Polyploidization in liver tissue. Am J Pathol *184*, 322–331.

Gentric, G., Desdouets, C., and Celton-Morizur, S. (2012). Hepatocytes polyploidization and cell cycle control in liver physiopathology. Int J Hepatol *2012*, 282430.

Gentric, G., Maillet, V., Paradis, V., Couton, D., L'Hermitte, A., Panasyuk, G., Fromenty, B., Celton-Morizur, S., and Desdouets, C. (2015). Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest *125*, 981–992.

Gerlyng, P., Abyholm, A., Grotmol, T., Erikstein, B., Huitfeldt, H.S., Stokke, T., and Seglen, P.O. (1993). Binucleation and polyploidization patterns in developmental and regenerative rat liver growth. Cell Prolif *26*, 557–565.

Germain, L., Blouin, M.J., and Marceau, N. (1988). Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components. Cancer Res *48*, 4909–4918.

Giardino Torchia, M.L., Dutta, D., Mittelstadt, P.R., Guha, J., Gaida, M.M., Fish, K., Barr, V.A., Akpan, I.O., Samelson, L.E., Tagad, H.D., et al. (2018). Intensity and duration of TCR signaling is limited by p38 phosphorylation of ZAP-70T293 and destabilization of the signalosome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *115*, 2174–2179.

Gilgenkrantz, H., and Collin de l'Hortet, A. (2018). Understanding Liver Regeneration: From Mechanisms to Regenerative Medicine. Am. J. Pathol. *188*, 1316–1327.

Glässner, A., Eisenhardt, M., Krämer, B., Körner, C., Coenen, M., Sauerbruch, T., Spengler, U., and Nattermann, J. (2012). NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *92*, 967–977.

Goldman, S.M., Quinlan, P.J., Ross, G.W., Marras, C., Meng, C., Bhudhikanok, G.S., Comyns, K., Korell, M., Chade, A.R., Kasten, M., et al. (2012). Solvent exposures and Parkinson disease risk in twins. Ann. Neurol. *71*, 776–784.

Goloudina, A., Yamaguchi, H., Chervyakova, D.B., Appella, E., Fornace, A.J., and Bulavin, D.V. (2003). Regulation of human Cdc25A stability by Serine 75 phosphorylation is not sufficient to activate a S phase checkpoint. Cell Cycle Georget. Tex *2*, 473–478.

Goloudina, A.R., Kochetkova, E.Y., Pospelova, T.V., and Demidov, O.N. (2016). Wip1 phosphatase: between p53 and MAPK kinases pathways. Oncotarget *7*, 31563–31571.

Gong, X., Ming, X., Deng, P., and Jiang, Y. (2010). Mechanisms regulating the nuclear translocation of p38 MAP kinase. J. Cell. Biochem. *110*, 1420–1429.

González-Terán, B., Cortés, J.R., Manieri, E., Matesanz, N., Verdugo, Á., Rodríguez, M.E., González-Rodríguez, Á., Valverde, Á.M., Valverde, Á., Martín, P., et al. (2013). Eukaryotic elongation factor 2 controls TNF-α translation in LPS-induced hepatitis. J. Clin. Invest. *123*, 164–178.

González-Terán, B., Matesanz, N., Nikolic, I., Verdugo, M.A., Sreeramkumar, V., Hernández-Cosido, L., Mora, A., Crainiciuc, G., Sáiz, M.L., Bernardo, E., et al. (2016). p38γ and p38δ reprogram liver metabolism by modulating neutrophil infiltration. EMBO J. *35*, 536–552.

Göpfert, T., Eckardt, K.U., Geb, B., and Kurtz, A. (1997). Oxygen-dependent regulation of erythropoietin gene expression in rat hepatocytes. Kidney Int. *51*, 502–506.

Gordillo, M., Evans, T., and Gouon-Evans, V. (2015). Orchestrating liver development. Dev. Camb. Engl. *142*, 2094–2108.

Guicciardi, M.E., Malhi, H., Mott, J.L., and Gores, G.J. (2013). Apoptosis and necrosis in the liver. Compr. Physiol. *3*, 977–1010.

Guidotti, J.E., Bregerie, O., Robert, A., Debey, P., Brechot, C., and Desdouets, C. (2003). Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. J Biol Chem *278*, 19095–19101.

Gunawan, B.K., Liu, Z.-X., Han, D., Hanawa, N., Gaarde, W.A., and Kaplowitz, N. (2006). c-Jun N-terminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity. Gastroenterology *131*, 165–178.

Gupta, S. (2000). Hepatic polyploidy and liver growth control. Semin Cancer Biol *10*, 161–171.

• H •

Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., and Ulevitch, R.J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. Science *265*, 808–811.

Han, J., Zhong, C.-Q., and Zhang, D.-W. (2011). Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. Nat. Immunol. *12*, 1143–1149.

Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *9*, 576–596.

Hasmall, S.C., and Roberts, R.A. (1997). Hepatic ploidy, nuclearity, and distribution of DNA synthesis: a comparison of nongenotoxic hepatocarcinogens with noncarcinogenic liver mitogens. Toxicol Appl Pharmacol *144*, 287–293.

Heard, K.J., Green, J.L., James, L.P., Judge, B.S., Zolot, L., Rhyee, S., and Dart, R.C. (2011). Acetaminophen-cysteine adducts during therapeutic dosing and following overdose. BMC Gastroenterol. *11*, 20.

Heinrichsdorff, J., Luedde, T., Perdiguero, E., Nebreda, A.R., and Pasparakis, M. (2008). p38 alpha MAPK inhibits JNK activation and collaborates with IkappaB kinase 2 to prevent endotoxin-induced liver failure. EMBO Rep. *9*, 1048–1054.

Henderson, N.C., Pollock, K.J., Frew, J., Mackinnon, A.C., Flavell, R.A., Davis, R.J., Sethi, T., and Simpson, K.J. (2007). Critical role of c-jun (NH2) terminal kinase in paracetamol- induced acute liver failure. Gut *56*, 982–990.

Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. Mol. Cell *1*, 3–11.

Heymann, F., Hamesch, K., Weiskirchen, R., and Tacke, F. (2015). The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. Lab. Anim. *49*, 12–20.

Hsieh, C.-C., Hung, C.-H., Lu, L., and Qian, S. (2015). Hepatic immune tolerance induced by hepatic stellate cells. World J. Gastroenterol. *21*, 11887–11892.

Hsu, S.H., Delgado, E.R., Otero, P.A., Teng, K.Y., Kutay, H., Meehan, K.M., Moroney, J.B., Monga, J.K., Hand, N.J., Friedman, J.R., et al. (2016). MicroRNA-122 regulates polyploidization in the murine liver. Hepatology *64*, 599–615.

Hui, L., Bakiri, L., Mairhorfer, A., Schweifer, N., Haslinger, C., Kenner, L., Komnenovic, V., Scheuch, H., Beug, H., and Wagner, E.F. (2007a). p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. Nat Genet *39*, 741–749.

Hui, L., Bakiri, L., Stepniak, E., and Wagner, E.F. (2007b). p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. Cell Cycle *6*, 2429–2433.

Hvidberg, A., Djurup, R., and Hilsted, J. (1994). Glucose recovery after intranasal glucagon during hypoglycaemia in man. Eur. J. Clin. Pharmacol. *46*, 15–17.

• I •

Ikarashi, M., Nakashima, H., Kinoshita, M., Sato, A., Nakashima, M., Miyazaki, H., Nishiyama, K., Yamamoto, J., and Seki, S. (2013). Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages. J. Leukoc. Biol. *94*, 1325–1336.

Inoue, H., Ogawa, W., Asakawa, A., Okamoto, Y., Nishizawa, A., Matsumoto, M., Teshigawara, K., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., et al. (2006). Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. Cell Metab. *3*, 267–275.

Ipsen, D.H., Lykkesfeldt, J., and Tveden-Nyborg, P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. Cell. Mol. Life Sci. CMLS.

Itoh, T., and Miyajima, A. (2014). Liver regeneration by stem/progenitor cells. Hepatol. Baltim. Md *59*, 1617–1626.

Ittner, A., Block, H., Reichel, C.A., Varjosalo, M., Gehart, H., Sumara, G., Gstaiger, M., Krombach, F., Zarbock, A., and Ricci, R. (2012). Regulation of PTEN activity by p38δ-PKD1 signaling in neutrophils confers inflammatory responses in the lung. J. Exp. Med. *209*, 2229–2246.

Iyoda, K., Sasaki, Y., Horimoto, M., Toyama, T., Yakushijin, T., Sakakibara, M., Takehara, T., Fujimoto, J., Hori, M., Wands, J.R., et al. (2003). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. Cancer *97*, 3017–3026.

• J •

Jaeschke, H. (2015). Acetaminophen: Dose-Dependent Drug Hepatotoxicity and Acute Liver Failure in Patients. Dig. Dis. Basel Switz. *33*, 464–471.

Jaeschke, H., McGill, M.R., Williams, C.D., and Ramachandran, A. (2011). Current issues with acetaminophen hepatotoxicity--a clinically relevant model to test the efficacy of natural products. Life Sci. *88*, 737–745.

Jaeschke, H., Duan, L., Akakpo, J.Y., Farhood, A., and Ramachandran, A. (2018). The role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc. *118*, 709–718.

Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K.B., Awuh, J.A., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J.D., and Johansen, T. (2010). p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. J. Biol. Chem. *285*, 22576–22591.

Jakowlew, S.B., Mead, J.E., Danielpour, D., Wu, J., Roberts, A.B., and Fausto, N. (1991). Transforming growth factor-beta isoforms in rat liver regeneration : messenger RNA expression and activation of latent TGF-beta. Cell Regul *2*, 535–548.

Janakat, S., and Al-Merie, H. (2002). Optimization of the dose and route of injection, and characterisation of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. J. Pharmacol. Toxicol. Methods *48*, 41–44.

Jenne, C.N., and Kubes, P. (2013). Immune surveillance by the liver. Nat. Immunol. *14*, 996–1006.

Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J.A., Lin, S., and Han, J. (1996). Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). J. Biol. Chem. *271*, 17920–17926.

Jiang, Y., Gram, H., Zhao, M., New, L., Gu, J., Feng, L., Di Padova, F., Ulevitch, R.J., and Han, J. (1997). Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. J. Biol. Chem. *272*, 30122–30128.

Jin, J., Hong, I.-H., Lewis, K., Iakova, P., Breaux, M., Jiang, Y., Sullivan, E., Jawanmardi, N., Timchenko, L., and Timchenko, N.A. (2015). Cooperation of C/EBP family proteins and chromatin remodeling proteins is essential for termination of liver regeneration. Hepatol. Baltim. Md *61*, 315–325.

Jing, Y., Liu, W., Cao, H., Zhang, D., Yao, X., Zhang, S., Xia, H., Li, D., Wang, Y., Yan, J., et al. (2015). Hepatic p38α regulates gluconeogenesis by suppressing AMPK. J. Hepatol. *62*, 1319–1327.

Johnson, G.R., and Moore, M.A. (1975). Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. Nature *258*, 726–728.

Ju, C., and Tacke, F. (2016). Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. Cell. Mol. Immunol. *13*, 316–327.

Ju, C., Reilly, T.P., Bourdi, M., Radonovich, M.F., Brady, J.N., George, J.W., and Pohl, L.R. (2002). Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. Chem. Res. Toxicol. *15*, 1504–1513.

• K •

Kadowaki, S., Meguro, S., Imaizumi, Y., Sakai, H., Endoh, D., and Hayashi, M. (2013). Role of p38 Mapk in development of acute hepatic injury in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats, an animal model of human Wilson's disease. J. Vet. Med. Sci. *75*, 1551–1556.

Kaiser, W.J., Upton, J.W., Long, A.B., Livingston-Rosanoff, D., Daley-Bauer, L.P., Hakem, R., Caspary, T., and Mocarski, E.S. (2011). RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. Nature *471*, 368–372.

Kalkavan, H., and Green, D.R. (2018). MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. Cell Death Differ. *25*, 46–55.

Kang, Y.J., Chen, J., Otsuka, M., Mols, J., Ren, S., Wang, Y., and Han, J. (2008). Macrophage deletion of p38alpha partially impairs lipopolysaccharide-induced cellular activation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *180*, 5075–5082.

Kang, Y.J., Bang, B.-R., Otsuka, M., and Otsu, K. (2015). Tissue-Specific Regulation of p38α-Mediated Inflammation in Con A-Induced Acute Liver Damage. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *194*, 4759–4766.

Keil, E., Höcker, R., Schuster, M., Essmann, F., Ueffing, N., Hoffman, B., Liebermann, D.A., Pfeffer, K., Schulze-Osthoff, K., and Schmitz, I. (2013). Phosphorylation of Atg5 by the Gadd45β-MEKK4-p38 pathway inhibits autophagy. Cell Death Differ. *20*, 321–332.

Keshet, Y., and Seger, R. (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *661*, 3–38.

Kew, M.C. (2000). Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. Lancet Lond. Engl. *355*, 591–592.

Khan, H.A., Ahmad, M.Z., Khan, J.A., and Arshad, M.I. (2017). Crosstalk of liver immune cells and cell death mechanisms in different murine models of liver injury and its clinical relevance. Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. HBPD INT *16*, 245–256.

Kim, G.-Y., Mercer, S.E., Ewton, D.Z., Yan, Z., Jin, K., and Friedman, E. (2002). The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation. J. Biol. Chem. *277*, 29792–29802.

Kishi, H., Nakagawa, K., Matsumoto, M., Suga, M., Ando, M., Taya, Y., and Yamaizumi, M. (2001). Osmotic shock induces G1 arrest through p53 phosphorylation at Ser33 by activated p38MAPK without phosphorylation at Ser15 and Ser20. J. Biol. Chem. *276*, 39115–39122.

Kiso, K., Ueno, S., Fukuda, M., Ichi, I., Kobayashi, K., Sakai, T., Fukui, K., and Kojo, S. (2012). The role of Kupffer cells in carbon tetrachloride intoxication in mice. Biol. Pharm. Bull. *35*, 980–983.

Knockaert, L., Berson, A., Ribault, C., Prost, P.-E., Fautrel, A., Pajaud, J., Lepage, S., Lucas-Clerc, C., Bégué, J.-M., Fromenty, B., et al. (2012). Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *92*, 396–410.

Koch, D.G., Speiser, J.L., Durkalski, V., Fontana, R.J., Davern, T., McGuire, B., Stravitz, R.T., Larson, A.M., Liou, I., Fix, O., et al. (2017). The Natural History of Severe Acute Liver Injury. Am. J. Gastroenterol. *112*, 1389–1396.

Kudira, R., Malinka, T., Kohler, A., Dosch, M., de Agüero, M.G., Melin, N., Haegele, S., Starlinger, P., Maharjan, N., Saxena, S., et al. (2016). P2X1-regulated IL-22 secretion by innate lymphoid cells is required for efficient liver regeneration. Hepatol. Baltim. Md *63*, 2004–2017.

Kudryavtsev, B.N., Kudryavtseva, M.V., Sakuta, G.A., and Stein, G.I. (1993). Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol *64*, 387–393.

Kumar, S., McDonnell, P.C., Gum, R.J., Hand, A.T., Lee, J.C., and Young, P.R. (1997). Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. Biochem. Biophys. Res. Commun. *235*, 533–538.

Kundu, M., Pathak, S.K., Kumawat, K., Basu, S., Chatterjee, G., Pathak, S., Noguchi, T., Takeda, K., Ichijo, H., Thien, C.B.F., et al. (2009). A TNF- and c-Cbl-dependent FLIP(S)-degradation pathway and its function in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage apoptosis. Nat. Immunol. *10*, 918–926.

Kuo, T.-C., and Chao, C.C.-K. (2010). Hepatitis B virus X protein prevents apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by upregulating SATB1 and HURP expression. Biochem. Pharmacol. *80*, 1093–1102.

Kurata, S. (2000). Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. J. Biol. Chem. *275*, 23413–23416.

Kurioka, A., Walker, L.J., Klenerman, P., and Willberg, C.B. (2016). MAIT cells: new guardians of the liver. Clin. Transl. Immunol. *5*, e98.

• L •

Lafarga, V., Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2007). p18(Hamlet) mediates different p53-dependent responses to DNA-damage inducing agents. Cell Cycle Georget. Tex *6*, 2319–2322.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Curr. Biol. CB *12*, 735–739.

Lapierre, P., and Alvarez, F. (2007). [The liver: an organ of the immune system?]. Med. Sci. MS *23*, 985–990.

Larson, A.M. (2007). Acetaminophen hepatotoxicity. Clin. Liver Dis. *11*, 525–548, vi.

Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Müller, R., and Pouysségur, J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. J. Biol. Chem. *271*, 20608–20616.

Lawan, A., Zhang, L., Gatzke, F., Min, K., Jurczak, M.J., Al-Mutairi, M., Richter, P., Camporez, J.P.G., Couvillon, A., Pesta, D., et al. (2015). Hepatic mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 selectively regulates glucose metabolism and energy homeostasis. Mol. Cell. Biol. *35*, 26–40.

Lee, J., Sun, C., Zhou, Y., Lee, J., Gokalp, D., Herrema, H., Park, S.W., Davis, R.J., and Ozcan, U. (2011). p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis. Nat. Med. *17*, 1251–1260.

Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., et al. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. Nature *372*, 739–746.

Lee, Y.J., Holzapfel, K.L., Zhu, J., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2013). Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. Nat. Immunol. *14*, 1146–1154.

Lemaire, M., Froment, C., Boutros, R., Mondesert, O., Nebreda, A.R., Monsarrat, B., and Ducommun, B. (2006). CDC25B phosphorylation by p38 and MK-2. Cell Cycle Georget. Tex *5*, 1649–1653.

Li, J., and Holbrook, N.J. (2003). Common mechanisms for declines in oxidative stress tolerance and proliferation with aging. Free Radic. Biol. Med. *35*, 292–299.

Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J., and Han, J. (1996). The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. Biochem. Biophys. Res. Commun. *228*, 334–340.

Lian, Z.-X., Okada, T., He, X.-S., Kita, H., Liu, Y.-J., Ansari, A.A., Kikuchi, K., Ikehara, S., and Gershwin, M.E. (2003). Heterogeneity of dendritic cells in the mouse liver: identification and characterization of four distinct populations. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *170*, 2323–2330.

Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E.W., and Sun, S.-C. (2004). Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. J. Biol. Chem. *279*, 26243–26250.

Lieber, C.S., Jones, D.P., and Decarli, L.M. (1965). EFFECTS OF PROLONGED ETHANOL INTAKE: PRODUCTION OF FATTY LIVER DESPITE ADEQUATE DIETS. J. Clin. Invest. *44*, 1009–1021.

Liedtke, C., Luedde, T., Sauerbruch, T., Scholten, D., Streetz, K., Tacke, F., Tolba, R., Trautwein, C., Trebicka, J., and Weiskirchen, R. (2013). Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. Fibrogenesis Tissue Repair *6*, 19.

Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H.G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P.A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. Nat. Med. *6*, 1348–1354.

Linkermann, A., and Green, D.R. (2014). Necroptosis. N. Engl. J. Med. *370*, 455–465.

Liu, J., Zhang, S., Cao, H., Wang, H., Sun, C., Liu, S., Yu, S., Li, Y., Liu, W., Wang, H., et al. (2017a). Deficiency of p38α in macrophage ameliorates d-galactosamine/TNF-α-induced acute liver injury in mice. FEBS J. *284*, 4200–4215.

Liu, J., Zhang, S., Cao, H., Wang, H., Sun, C., Liu, S., Yu, S., Li, Y., Liu, W., Wang, H., et al. (2017b). Deficiency of p38α in macrophage ameliorates D -galactosamine/TNF-α-induced acute liver injury in mice. FEBS J. *284*, 4200–4215.

Liu, Y., Gorospe, M., Yang, C., and Holbrook, N.J. (1995). Role of mitogen-activated protein kinase phosphatase during the cellular response to genotoxic stress. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase activity and AP-1-dependent gene activation. J. Biol. Chem. *270*, 8377–8380.

Louis, H., Van Laethem, J.L., Wu, W., Quertinmont, E., Degraef, C., Van den Berg, K., Demols, A., Goldman, M., Le Moine, O., Geerts, A., et al. (1998). Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration,

hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. Hepatol. Baltim. Md *28*, 1607–1615.

Lu, P., Prost, S., Caldwell, H., Tugwood, J.D., Betton, G.R., and Harrison, D.J. (2007). Microarray analysis of gene expression of mouse hepatocytes of different ploidy. Mamm Genome *18*, 617–626.

Luedde, T., Kaplowitz, N., and Schwabe, R.F. (2014). Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. Gastroenterology *147*, 765-783.e4.

• M •

Ma, C., Kesarwala, A.H., Eggert, T., Medina-Echeverz, J., Kleiner, D.E., Jin, P., Stroncek, D.F., Terabe, M., Kapoor, V., ElGindi, M., et al. (2016). NAFLD causes selective CD4(+) T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. Nature *531*, 253–257.

Macdonald, R.A. (1961). Experimental carcinoma of the liver. “Regeneration” of liver cells in premalignant stages. Am. J. Pathol. *39*, 209–220.

Macias-Silva, M., Li, W., Leu, J.I., Crissey, M.A.S., and Taub, R. (2002). Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration. J. Biol. Chem. *277*, 28483–28490.

Madra, S., Styles, J., and Smith, A.G. (1995). Perturbation of hepatocyte nuclear populations induced by iron and polychlorinated biphenyls in C57BL/10ScSn mice during carcinogenesis. Carcinogenesis *16*, 719–727.

Maes, M., Vinken, M., and Jaeschke, H. (2016). Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. Toxicol. Appl. Pharmacol. *290*, 86–97.

Manno, M., Ferrara, R., Cazzaro, S., Rigotti, P., and Ancona, E. (1992). Suicidal inactivation of human cytochrome P-450 by carbon tetrachloride and halothane in vitro. Pharmacol. Toxicol. *70*, 13–18.

Mao, S.A., Glorioso, J.M., and Nyberg, S.L. (2014). Liver regeneration. Transl. Res. J. Lab. Clin. Med. *163*, 352–362.

Margall-Ducos, G., Celton-Morizur, S., Couton, D., Bregerie, O., and Desdouets, C. (2007). Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. J Cell Sci *120*, 3633–3639.

Markose, D., Kirkland, P., Ramachandran, P., and Henderson, N.C. (2018). Immune cell regulation of liver regeneration and repair. J. Immunol. Regen. Med. *2*, 1–10.

Martin, S.J., and Henry, C.M. (2013). Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities. Methods San Diego Calif *61*, 87–89.

Martin, N.C., McGregor, A.H., Sansom, N., Gould, S., and Harrison, D.J. (2001). Phenobarbitone-induced ploidy changes in liver occur independently of p53. Toxicol Lett *119*, 109–115.

Martindale, J.L., and Holbrook, N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. J. Cell. Physiol. *192*, 1–15.

Martinou, J.-C., and Youle, R.J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. Dev. Cell *21*, 92–101.

Matsukawa, J., Matsuzawa, A., Takeda, K., and Ichijo, H. (2004). The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. J. Biochem. (Tokyo) *136*, 261–265.

Mayor, F., Jurado-Pueyo, M., Campos, P.M., and Murga, C. (2007). Interfering with MAP kinase docking interactions: implications and perspective for the p38 route. Cell Cycle Georget. Tex *6*, 528–533.

McGill, M.R., Lebofsky, M., Norris, H.-R.K., Slawson, M.H., Bajt, M.L., Xie, Y., Williams, C.D., Wilkins, D.G., Rollins, D.E., and Jaeschke, H. (2013). Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: dose-response, mechanisms, and clinical implications. Toxicol. Appl. Pharmacol. *269*, 240–249.

McGill, M.R., Li, F., Sharpe, M.R., Williams, C.D., Curry, S.C., Ma, X., and Jaeschke, H. (2014). Circulating acylcarnitines as biomarkers of mitochondrial dysfunction after acetaminophen overdose in mice and humans. Arch. Toxicol. *88*, 391–401.

Mehendale, H.M. (2005). Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury. Toxicol. Pathol. *33*, 41–51.

Melchiorri, C., Chieco, P., Zedda, A.I., Coni, P., Ledda-Columbano, G.M., and Columbano, A. (1993). Ploidy and nuclearity of rat hepatocytes after compensatory regeneration or mitogen-induced liver growth. Carcinogenesis *14*, 1825–1830.

Melhem, A., Muhanna, N., Bishara, A., Alvarez, C.E., Ilan, Y., Bishara, T., Horani, A., Nassar, M., Friedman, S.L., and Safadi, R. (2006). Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. J. Hepatol. *45*, 60–71.

Mendelson, K.G., Contois, L.R., Tevosian, S.G., Davis, R.J., and Paulson, K.E. (1996). Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 12908–12913.

Meng, Z., Wang, Y., Wang, L., Jin, W., Liu, N., Pan, H., Liu, L., Wagman, L., Forman, B.M., and Huang, W. (2010). FXR regulates liver repair after CCl4-induced toxic injury. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *24*, 886–897.

Menken, M., Waggoner, J.G., and Berlin, N.I. (1966). The influence of bilirubin on oxidative phosphorylation and related reactions in brain and liver mitochondria: effects of protein-binding. J. Neurochem. *13*, 1241–1248.

Michalopoulos, G.K. (2017). Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. Hepatol. Baltim. Md *65*, 1384–1392.

Miettinen, T.P., Pessa, H.K.J., Caldez, M.J., Fuhrer, T., Diril, M.K., Sauer, U., Kaldis, P., and Björklund, M. (2014). Identification of transcriptional and metabolic programs related to mammalian cell size. Curr. Biol. CB *24*, 598–608.

Mikule, K., Delaval, B., Kaldis, P., Jurcyzk, A., Hergert, P., and Doxsey, S. (2007). Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest. Nat Cell Biol *9*, 160–170.

Miller, R.T., Shah, R.S., Cattley, R.C., and Popp, J.A. (1996). The peroxisome proliferations WY-14,643 and methylclofenapate induce hepatocyte ploidy alterations and ploidy-specific DNA synthesis in F344 rats. Toxicol Appl Pharmacol *138*, 317–323.

Min, L., He, B., and Hui, L. (2011). Mitogen-activated protein kinases in hepatocellular carcinoma development. Semin. Cancer Biol. *21*, 10–20.

Miyao, M., Kotani, H., Ishida, T., Kawai, C., Manabe, S., Abiru, H., and Tamaki, K. (2015). Pivotal role of liver sinusoidal endothelial cells in NAFLD/NASH progression. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *95*, 1130–1144.

Miyaoka, Y., Ebato, K., Kato, H., Arakawa, S., Shimizu, S., and Miyajima, A. (2012). Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. Curr Biol *22*, 1166–1175.

Monga, S.P., Pediaditakis, P., Mule, K., Stolz, D.B., and Michalopoulos, G.K. (2001). Changes in WNT/beta-catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration. Hepatol. Baltim. Md *33*, 1098–1109.

Morandell, S., Reinhardt, H.C., Cannell, I.G., Kim, J.S., Ruf, D.M., Mitra, T., Couvillon, A.D., Jacks, T., and Yaffe, M.B. (2013). A reversible gene-targeting strategy identifies synthetic lethal interactions between MK2 and p53 in the DNA damage response in vivo. Cell Rep. *5*, 868–877.

Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., et al. (1996). A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. J. Biol. Chem. *271*, 13675–13679.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat. Rev. Immunol. *8*, 958–969.

Mudgett, J.S., Ding, J., Guh-Siesel, L., Chartrain, N.A., Yang, L., Gopal, S., and Shen, M.M. (2000). Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 10454–10459.

Muramatsu, Y., Yamada, T., Moralejo, D.H., Mochizuki, H., Sogawa, K., and Matsumoto, K. (2000). Increased polyploid incidence is associated with abnormal copper accumulation in the liver of LEC mutant rat. Res Commun Mol Pathol Pharmacol *107*, 129–136.

Müsch, A. (2014). The unique polarity phenotype of hepatocytes. Exp. Cell Res. *328*, 276–283.

• N •

Na, T.-Y., Han, Y.-H., Ka, N.-L., Park, H.-S., Kang, Y.P., Kwon, S.W., Lee, B.-H., and Lee, M.-O. (2015). 22-S-Hydroxycholesterol protects against ethanol-induced liver injury by blocking the auto/paracrine activation of MCP-1 mediated by LXRα. J. Pathol. *235*, 710–720.

Nadal, C., and Zajdela, F. (1967). [Hepatic polyploidy in the rat. IV. Experimental changes in the nucleolar volume of liver cells and their mechanisms of regulation]. Exp. Cell Res. *48*, 518–528.

Nagaleekar, V.K., Sabio, G., Aktan, I., Chant, A., Howe, I.W., Thornton, T.M., Benoit, P.J., Davis, R.J., Rincon, M., and Boyson, J.E. (2011). Translational control of NKT cell cytokine production by p38 MAPK. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *186*, 4140–4146.

Nakagawa, H., Maeda, S., Hikiba, Y., Ohmae, T., Shibata, W., Yanai, A., Sakamoto, K., Ogura, K., Noguchi, T., Karin, M., et al. (2008). Deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates acetaminophen-induced liver injury by inhibiting c-Jun N-terminal kinase activation. Gastroenterology *135*, 1311–1321.

Nakashima, M., Kinoshita, M., Nakashima, H., Habu, Y., Miyazaki, H., Shono, S., Hiroi, S., Shinomiya, N., Nakanishi, K., and Seki, S. (2012). Pivotal advance: characterization of mouse liver phagocytic B cells in innate immunity. J. Leukoc. Biol. *91*, 537–546.

New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L.J., Kato, Y., Parry, G.C., and Han, J. (1998). PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. EMBO J. *17*, 3372–3384.

• O •

Ono, K., and Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. Cell Signal *12*, 1–13.

Ouwens, D.M., de Ruiter, N.D., van der Zon, G.C.M., Carter, A.P., Schouten, J., van der Burgt, C., Kooistra, K., Bos, J.L., Maassen, J.A., and van Dam, H. (2002). Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. EMBO J. *21*, 3782–3793.

• P •

Pandit, S.K., Westendorp, B., Nantasanti, S., van Liere, E., Tooten, P.C.J., Cornelissen, P.W.A., Toussaint, M.J.M., Lamers, W.H., and de Bruin, A. (2012). E2F8 is essential for polyploidization in mammalian cells. Nat. Cell Biol. *14*, 1181–1191.

Paranjpe, S., Bowen, W.C., Mars, W.M., Orr, A., Haynes, M.M., DeFrances, M.C., Liu, S., Tseng, G.C., Tsagianni, A., and Michalopoulos, G.K. (2016). Combined systemic elimination of MET and epidermal growth factor receptor signaling completely abolishes liver regeneration and leads to liver decompensation. Hepatol. Baltim. Md *64*, 1711–1724.

Park, O., Jeong, W.-I., Wang, L., Wang, H., Lian, Z.-X., Gershwin, M.E., and Gao, B. (2009). Diverse roles of invariant natural killer T cells in liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride. Hepatol. Baltim. Md *49*, 1683–1694.

Pattison, M.J., Mitchell, O., Flynn, H.R., Chen, C.-S., Yang, H.-T., Ben-Addi, H., Boeing, S., Snijders, A.P., and Ley, S.C. (2016). TLR and TNF-R1 activation of the MKK3/MKK6-p38α axis in macrophages is mediated by TPL-2 kinase. Biochem. J. *473*, 2845–2861.

Pediaditakis, P., Lopez-Talavera, J.C., Petersen, B., Monga, S.P., and Michalopoulos, G.K. (2001). The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. Hepatol. Baltim. Md *34*, 688–693.

Pedraza-Alva, G., Koulnis, M., Charland, C., Thornton, T., Clements, J.L., Schlissel, M.S., and Rincón, M. (2006). Activation of p38 MAP kinase by DNA double-strand breaks in V(D)J recombination induces a G2/M cell cycle checkpoint. EMBO J. *25*, 763–773.

Peña-Oyarzun, D., Bravo-Sagua, R., Diaz-Vega, A., Aleman, L., Chiong, M., Garcia, L., Bambs, C., Troncoso, R., Cifuentes, M., Morselli, E., et al. (2018). Autophagy and oxidative stress in non-communicable diseases: A matter of the inflammatory state? Free Radic. Biol. Med. *124*, 61–78.

Perdrix, A., Najem, A., Saussez, S., Awada, A., Journe, F., Ghanem, G., and Krayem, M. (2017). PRIMA-1 and PRIMA-1Met (APR-246): From Mutant/Wild Type p53 Reactivation to Unexpected Mechanisms Underlying Their Potent Anti-Tumor Effect in Combinatorial Therapies. Cancers *9*.

Pérez, S., Rius-Pérez, S., Tormos, A.M., Finamor, I., Nebreda, Á.R., Taléns-Visconti, R., and Sastre, J. (2018). Age-dependent regulation of antioxidant genes by p38α MAPK in the liver. Redox Biol. *16*, 276–284.

Perkins, N.D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 49–62.

Pin, A.-L., Houle, F., Guillonneau, M., Paquet, E.R., Simard, M.J., and Huot, J. (2012). miR-20a represses endothelial cell migration by targeting MKK3 and inhibiting p38 MAP kinase activation in response to VEGF. Angiogenesis *15*, 593–608.

Poisson, J., Lemoinne, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., and Rautou, P.-E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. J. Hepatol. *66*, 212–227.

• R •

Radaeva, S., Sun, R., Pan, H.-N., Hong, F., and Gao, B. (2004). Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. Hepatol. Baltim. Md *39*, 1332–1342.

Radaeva, S., Sun, R., Jaruga, B., Nguyen, V.T., Tian, Z., and Gao, B. (2006). Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. Gastroenterology *130*, 435–452.

Ramachandran, A., McGill, M.R., Xie, Y., Ni, H.-M., Ding, W.-X., and Jaeschke, H. (2013). Receptor interacting protein kinase 3 is a critical early mediator of acetaminophen-induced hepatocyte necrosis in mice. Hepatol. Baltim. Md *58*, 2099–2108.

Raman, M., Earnest, S., Zhang, K., Zhao, Y., and Cobb, M.H. (2007). TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage. EMBO J. *26*, 2005–2014.

Rappaport, A.M., Borowy, Z.J., Lougheed, W.M., and Lotto, W.N. (1954). Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. Anat. Rec. *119*, 11–33.

Raslova, H., Kauffmann, A., Sekkai, D., Ripoche, H., Larbret, F., Robert, T., Le Roux, D.T., Kroemer, G., Debili, N., Dessen, P., et al. (2007). Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. Blood *109*, 3225–3234.

Recknagel, R.O., Glende, E.A., Dolak, J.A., and Waller, R.L. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. Pharmacol. Ther. *43*, 139–154.

Remy, G., Risco, A.M., Iñesta-Vaquera, F.A., González-Terán, B., Sabio, G., Davis, R.J., and Cuenda, A. (2010). Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3. Cell. Signal. *22*, 660–667.

Reyskens, K.M.S.E., and Arthur, J.S.C. (2016). Emerging Roles of the Mitogen and Stress Activated Kinases MSK1 and MSK2. Front. Cell Dev. Biol. *4*, 56.

Risco, A., del Fresno, C., Mambol, A., Alsina-Beauchamp, D., MacKenzie, K.F., Yang, H.-T., Barber, D.F., Morcelle, C., Arthur, J.S.C., Ley, S.C., et al. (2012). p38γ and p38δ kinases regulate the Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cytokine production by controlling ERK1/2 protein kinase pathway activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 11200–11205.

Rother, K., Kirschner, R., Sänger, K., Böhlig, L., Mössner, J., and Engeland, K. (2007). p53 downregulates expression of the G1/S cell cycle phosphatase Cdc25A. Oncogene *26*, 1949–1953.

Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A.R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. Cell *78*, 1027–1037.

Rudalska, R., Dauch, D., Longerich, T., McJunkin, K., Wuestefeld, T., Kang, T.-W., Hohmeyer, A., Pesic, M., Leibold, J., von Thun, A., et al. (2014). In vivo RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer. Nat. Med. *20*, 1138–1146.

Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. Compr. Physiol. *4*, 177–197.

• S •

Sabio, G., Arthur, J.S.C., Kuma, Y., Peggie, M., Carr, J., Murray-Tait, V., Centeno, F., Goedert, M., Morrice, N.A., and Cuenda, A. (2005). p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. EMBO J. *24*, 1134–1145.

Saito, C., Zwingmann, C., and Jaeschke, H. (2010). Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. Hepatol. Baltim. Md *51*, 246–254.

Sakurai, T., He, G., Matsuzawa, A., Yu, G.-Y., Maeda, S., Hardiman, G., and Karin, M. (2008). Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. Cancer Cell *14*, 156–165.

Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Guszczynski, T., Copeland, T.D., Yamaguchi, H., Appella, E., Fornace, A.J., and Ashwell, J.D. (2005a). Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. Nat. Immunol. *6*, 390–395.

Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Belova, G.I., Fornace, A.J., and Ashwell, J.D. (2005b). The autoimmune suppressor Gadd45alpha inhibits the T cell alternative p38 activation pathway. Nat. Immunol. *6*, 396–402.

Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2018). Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. Cell Metab. *27*, 22–41.

Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C., and Weiskirchen, R. (2015). The carbon tetrachloride model in mice. Lab. Anim. *49*, 4–11.

Schutz, Y. (2011). Protein turnover, ureagenesis and gluconeogenesis. Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Vitam.- Ernahrungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr. *81*, 101–107.

Schwabe, R.F., Bradham, C.A., Uehara, T., Hatano, E., Bennett, B.L., Schoonhoven, R., and Brenner, D.A. (2003). c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. Hepatol. Baltim. Md *37*, 824–832.

Schwerk, C., and Schulze-Osthoff, K. (2005). Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. Mol. Cell *19*, 1–13.

Seglen, P.O. (1997). DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival. Cell Biol. Toxicol. *13*, 301–315.

Seitz, H.K., and Stickel, F. (2007). Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. Nat. Rev. Cancer *7*, 599–612.

Semela, D., and Dufour, J.-F. (2004). Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. J. Hepatol. *41*, 864–880.

Shambaugh, G.E. (1977). Urea biosynthesis I. The urea cycle and relationships to the citric acid cycle. Am. J. Clin. Nutr. *30*, 2083–2087.

Shi, F.-D., Ljunggren, H.-G., La Cava, A., and Van Kaer, L. (2011). Organ-specific features of natural killer cells. Nat. Rev. Immunol. *11*, 658–671.

Shiojiri, N., Lemire, J.M., and Fausto, N. (1991). Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. Cancer Res *51*, 2611–2620.

Shteyer, E., Liao, Y., Muglia, L.J., Hruz, P.W., and Rudnick, D.A. (2004). Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. Hepatol. Baltim. Md *40*, 1322–1332.

Shuai, Z., Leung, M.W., He, X., Zhang, W., Yang, G., Leung, P.S., and Eric Gershwin, M. (2016). Adaptive immunity in the liver. Cell. Mol. Immunol. *13*, 354–368.

Sigal, S.H., Rajvanshi, P., Gorla, G.R., Sokhi, R.P., Saxena, R., Gebhard, D.R., Reid, L.M., and Gupta, S. (1999). Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. Am J Physiol *276*, G1260-72.

Simone, C., Forcales, S.V., Hill, D.A., Imbalzano, A.N., Latella, L., and Puri, P.L. (2004). p38 pathway targets SWI-SNF chromatin-remodeling complex to muscle-specific loci. Nat. Genet. *36*, 738–743.

Singh, R.K., Diwan, M., Dastidar, S.G., and Najmi, A.K. (2018). Differential effect of p38 and MK2 kinase inhibitors on the inflammatory and toxicity biomarkers in vitro. Hum. Exp. Toxicol. *37*, 521–531.

Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P., and Duncan, S.A. (2010). Organogenesis and development of the liver. Dev. Cell *18*, 175–189.

Sjögren, K., Liu, J.L., Blad, K., Skrtic, S., Vidal, O., Wallenius, V., LeRoith, D., Törnell, J., Isaksson, O.G., Jansson, J.O., et al. (1999). Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 7088–7092.

Skov Olsen, P., Boesby, S., Kirkegaard, P., Therkelsen, K., Almdal, T., Poulsen, S.S., and Nexø, E. (1988). Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. Hepatol. Baltim. Md *8*, 992–996.

Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., Bulow, V. von, Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C.-H., and Landström, M. (2008). The type I TGF-β receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. Nat. Cell Biol. *10*, 1199–1207.

Stepniak, E., Ricci, R., Eferl, R., Sumara, G., Sumara, I., Rath, M., Hui, L., and Wagner, E.F. (2006). c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. Genes Dev. *20*, 2306–2314.

Stöcker, E., and Heine, W.D. (1971). Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. Beitr. Pathol. *144*, 400–408.

Stoop, J.N., van der Molen, R.G., Baan, C.C., van der Laan, L.J.W., Kuipers, E.J., Kusters, J.G., and Janssen, H.L.A. (2005). Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. Hepatol. Baltim. Md *41*, 771–778.

Stramucci, L., Pranteda, A., and Bossi, G. (2018). Insights of Crosstalk between p53 Protein and the MKK3/MKK6/p38 MAPK Signaling Pathway in Cancer. Cancers *10*.

Sturchler, E., Feurstein, D., McDonald, P., and Duckett, D. (2010). Mechanism of oxidative stress-induced ASK1-catalyzed MKK6 phosphorylation. Biochemistry *49*, 4094–4102.

Suelves, M., Lluís, F., Ruiz, V., Nebreda, A.R., and Muñoz-Cánoves, P. (2004). Phosphorylation of MRF4 transactivation domain by p38 mediates repression of specific myogenic genes. EMBO J. *23*, 365–375.

Sun, F., Hamagawa, E., Tsutsui, C., Ono, Y., Ogiri, Y., and Kojo, S. (2001). Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver. Biochim. Biophys. Acta *1535*, 186–191.

Syal, G., Fausther, M., and Dranoff, J.A. (2012). Advances in cholangiocyte immunobiology. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. *303*, G1077-1086.

• T •

Tabibian, J.H., Masyuk, A.I., Masyuk, T.V., O'Hara, S.P., and LaRusso, N.F. (2013). Physiology of cholangiocytes. Compr. Physiol. *3*, 541–565.

Tacke, F., and Zimmermann, H.W. (2014). Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. J Hepatol *60*, 1090–1096.

Tagawa, Y., Sekikawa, K., and Iwakura, Y. (1997). Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *159*, 1418–1428.

Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. Nat. Med. *7*, 94–100.

Takekawa, M., Maeda, T., and Saito, H. (1998). Protein phosphatase 2Calpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. EMBO J. *17*, 4744–4752.

Takekawa, M., Adachi, M., Nakahata, A., Nakayama, I., Itoh, F., Tsukuda, H., Taya, Y., and Imai, K. (2000). p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. EMBO J. *19*, 6517–6526.

Talos, F., Nemajerova, A., Flores, E.R., Petrenko, O., and Moll, U.M. (2007). p73 suppresses polyploidy and aneuploidy in the absence of functional p53. Mol Cell *27*, 647–659.

Tan, X., Apte, U., Micsenyi, A., Kotsagrelos, E., Luo, J.-H., Ranganathan, S., Monga, D.K., Bell, A., Michalopoulos, G.K., and Monga, S.P.S. (2005). Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver. Gastroenterology *129*, 285–302.

Tanaka, N., Kamanaka, M., Enslen, H., Dong, C., Wysk, M., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (2002). Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis. EMBO Rep. *3*, 785–791.

Tanno, M., Bassi, R., Gorog, D.A., Saurin, A.T., Jiang, J., Heads, R.J., Martin, J.L., Davis, R.J., Flavell, R.A., and Marber, M.S. (2003). Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase

activation: evidence for MKK-independent activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. Circ. Res. *93*, 254–261.

Tannour-Louet, M., Porteu, A., Vaulont, S., Kahn, A., and Vasseur-Cognet, M. (2002). A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. Hepatology *35*, 1072–1081.

Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., and Nishida, E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. Nat. Cell Biol. *2*, 110–116.

Tateya, S., Rizzo, N.O., Handa, P., Cheng, A.M., Morgan-Stevenson, V., Daum, G., Clowes, A.W., Morton, G.J., Schwartz, M.W., and Kim, F. (2011). Endothelial NO/cGMP/VASP signaling attenuates Kupffer cell activation and hepatic insulin resistance induced by high-fat feeding. Diabetes *60*, 2792–2801.

Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. Nat Rev Mol Cell Biol *5*, 836–847.

Taylor, W.R., and Stark, G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. Oncogene *20*, 1803–1815.

Thapa, D., Nichols, C., Bassi, R., Martin, E.D., Verma, S., Conte, M.R., De Santis, V., De Nicola, G.F., and Marber, M.S. (2018). TAB1-Induced Autoactivation of p38α Mitogen-Activated Protein Kinase Is Crucially Dependent on Threonine 185. Mol. Cell. Biol. *38*.

Thornton, T.M., and Rincon, M. (2009). Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. Int J Biol Sci *5*, 44–51.

Tian, Z., Chen, Y., and Gao, B. (2013). Natural killer cells in liver disease. Hepatol. Baltim. Md *57*, 1654–1662.

Tokunaga, Y., Takeuchi, K., Takahashi, H., and Shimada, I. (2014). Allosteric enhancement of MAP kinase p38α's activity and substrate selectivity by docking interactions. Nat. Struct. Mol. Biol. *21*, 704–711.

Tormos, A.M., Arduini, A., Talens-Visconti, R., del Barco Barrantes, I., Nebreda, A.R., and Sastre, J. (2013a). Liver-specific p38α deficiency causes reduced cell growth and cytokinesis failure during chronic biliary cirrhosis in mice. Hepatology *57*, 1950–1961.

Tormos, A.M., Taléns-Visconti, R., Nebreda, A.R., and Sastre, J. (2013b). p38 MAPK: a dual role in hepatocyte proliferation through reactive oxygen species. Free Radic. Res. *47*, 905–916.

Tormos, A.M., Taléns-Visconti, R., and Sastre, J. (2015). Regulation of cytokinesis and its clinical significance. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. *52*, 159–167.

Tormos, A.M., Rius-Pérez, S., Jorques, M., Rada, P., Ramirez, L., Valverde, Á.M., Nebreda, Á.R., Sastre, J., and Taléns-Visconti, R. (2017). p38α regulates actin cytoskeleton and cytokinesis in hepatocytes during development and aging. PloS One *12*, e0171738.

Tosello-Trampont, A., Surette, F.A., Ewald, S.E., and Hahn, Y.S. (2017). Immunoregulatory Role of NK Cells in Tissue Inflammation and Regeneration. Front. Immunol. *8*, 301.

Toyoda, H., Bregerie, O., Vallet, A., Nalpas, B., Pivert, G., Brechot, C., and Desdouets, C. (2005). Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis. Gut *54*, 297–302.

Trempolec, N., Dave-Coll, N., and Nebreda, A.R. (2013). SnapShot: p38 MAPK substrates. Cell *152*, 924-924.e1.

Treyer, A., and Müsch, A. (2013). Hepatocyte polarity. Compr. Physiol. *3*, 243–287.

Tsou, A.-P., Yang, C.-W., Huang, C.-Y.F., Yu, R.C.-T., Lee, Y.-C.G., Chang, C.-W., Chen, B.-R., Chung, Y.-F., Fann, M.-J., Chi, C.-W., et al. (2003). Identification of a novel cell cycle regulated gene, HURP, overexpressed in human hepatocellular carcinoma. Oncogene *22*, 298–307.

Tsuchiya, A., Kaku, Y., Nakano, T., and Nishizaki, T. (2015). Diarachidonoylphosphoethanolamine induces apoptosis of malignant pleural mesothelioma cells through a Trx/ASK1/p38 MAPK pathway. J. Pharmacol. Sci. *129*, 160–168.

• V •

Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003). Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). EMBO J. *22*, 1313–1324.

Vitale, I., Senovilla, L., Galluzzi, L., Criollo, A., Vivet, S., Castedo, M., and Kroemer, G. (2008). Chk1 inhibition activates p53 through p38 MAPK in tetraploid cancer cells. Cell Cycle Georget. Tex *7*, 1956–1961.

Vitale, I., Jemaà, M., Senovilla, L., Galluzzi, L., Rello-Varona, S., Metivier, D., Ripoche, H., Lazar, V., Dessen, P., Castedo, M., et al. (2010). Involvement of p38alpha in the mitotic progression of p53(-/-) tetraploid cells. Cell Cycle Georget. Tex *9*, 2823–2829.

• W •

Wada, T., Stepniak, E., Hui, L., Leibbrandt, A., Katada, T., Nishina, H., Wagner, E.F., and Penninger, J.M. (2008). Antagonistic control of cell fates by JNK and p38-MAPK signaling. Cell Death Differ. *15*, 89–93.

Wagner, E.F., and Nebreda, A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. Nat. Rev. Cancer *9*, 537–549.

Wang, X.Z., and Ron, D. (1996). Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. Science *272*, 1347–1349.

Wang, D., Han, S., Peng, R., Jiao, C., Wang, X., Han, Z., and Li, X. (2014a). DUSP28 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulation of the p38 MAPK signaling. Int. J. Oncol. *45*, 2596–2604.

Wang, D.-W., Yin, Y.-M., and Yao, Y.-M. (2013a). Advances in the management of acute liver failure. World J. Gastroenterol. *19*, 7069–7077.

Wang, K., Zhang, T., Dong, Q., Nice, E.C., Huang, C., and Wei, Y. (2013b). Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation. Cell Death Dis. *4*, e537.

Wang, M.-J., Chen, F., Li, J.-X., Liu, C.-C., Zhang, H.-B., Xia, Y., Yu, B., You, P., Xiang, D., Lu, L., et al. (2014b). Reversal of hepatocyte senescence after continuous in vivo cell proliferation. Hepatol. Baltim. Md *60*, 349–361.

Wang, S.-C., Lin, X.-L., Li, J., Zhang, T.-T., Wang, H.-Y., Shi, J.-W., Yang, S., Zhao, W.-T., Xie, R.-Y., Wei, F., et al. (2014c). MicroRNA-122 triggers mesenchymal-epithelial transition and suppresses hepatocellular carcinoma cell motility and invasion by targeting RhoA. PloS One *9*, e101330.

Wang, S.N., Lee, K.T., Tsai, C.J., Chen, Y.J., and Yeh, Y.T. (2012). Phosphorylated p38 and JNK MAPK proteins in hepatocellular carcinoma. Eur J Clin Invest *42*, 1295–1301.

Wang, X., Liu, J.Z., Hu, J.X., Wu, H., Li, Y.L., Chen, H.L., Bai, H., and Hai, C.X. (2011). ROS-activated p38 MAPK/ERK-Akt cascade plays a central role in palmitic acid-stimulated hepatocyte proliferation. Free Radic. Biol. Med. *51*, 539–551.

Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., and Harris, C.C. (1999). GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 3706–3711.

Wang, Y., Cui, R., Zhang, X., Qiao, Y., Liu, X., Chang, Y., Yu, Y., Sun, F., and Wang, J. (2016). SIRT1 increases YAP- and MKK3-dependent p38 phosphorylation in mouse liver and human hepatocellular carcinoma. Oncotarget *7*, 11284–11298.

Warmerdam, D.O., Brinkman, E.K., Marteijn, J.A., Medema, R.H., Kanaar, R., and Smits, V.A.J. (2013). UV-induced G2 checkpoint depends on p38 MAPK and minimal activation of ATR-Chk1 pathway. J. Cell Sci. *126*, 1923–1930.

Watanabe, Y., Morita, M., and Akaike, T. (1996). Concanavalin A induces perforin-mediated but not Fas-mediated hepatic injury. Hepatol. Baltim. Md *24*, 702–710.

Weber, L.W.D., Boll, M., and Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. Crit. Rev. Toxicol. *33*, 105–136.

Weibel, E.R., Stäubli, W., Gnägi, H.R., and Hess, F.A. (1969). Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. J. Cell Biol. *42*, 68–91.

Weiner, H.L. (1997). Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. Immunol. Today *18*, 335–343.

Wendel, A., and Feuerstein, S. (1981). Drug-induced lipid peroxidation in mice--I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. Biochem. Pharmacol. *30*, 2513–2520.

Wheatley, D.N. (1972). Binucleation in mammalian liver. Studies on the control of cytokinesis in vivo. Exp Cell Res *74*, 455-65.

Wolber, E.-M., and Jelkmann, W. (2002). Thrombopoietin: the novel hepatic hormone. News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc. *17*, 6–10.

Wood, C.D., Thornton, T.M., Sabio, G., Davis, R.A., and Rincon, M. (2009). Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage. Int. J. Biol. Sci. *5*, 428–437.

Woolbright, B.L., and Jaeschke, H. (2015). Xenobiotic and Endobiotic Mediated Interactions Between the Cytochrome P450 System and the Inflammatory Response in the Liver. Adv. Pharmacol. San Diego Calif *74*, 131–161.

Wu, D., and Cederbaum, A.I. (2013). Inhibition of autophagy promotes CYP2E1-dependent toxicity in HepG2 cells via elevated oxidative stress, mitochondria dysfunction and activation of p38 and JNK MAPK. Redox Biol. *1*, 552–565.

Wynn, T.A., and Vannella, K.M. (2016). Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. Immunity *44*, 450–462.

• X •

Xiao, Y., Yan, W., Lu, L., Wang, Y., Lu, W., Cao, Y., and Cai, W. (2015). p38/p53/miR-200a-3p feedback loop promotes oxidative stress-mediated liver cell death. Cell Cycle Georget. Tex *14*, 1548–1558.

Xie, J., Yang, L., Tian, L., Li, W., Yang, L., and Li, L. (2016). Macrophage Migration Inhibitor Factor Upregulates MCP-1 Expression in an Autocrine Manner in Hepatocytes during Acute Mouse Liver Injury. Sci. Rep. *6*, 27665.

Xiong, Y., Collins, Q.F., An, J., Lupo, E., Liu, H.-Y., Liu, D., Robidoux, J., Liu, Z., and Cao, W. (2007). p38 mitogen-activated protein kinase plays an inhibitory role in hepatic lipogenesis. J. Biol. Chem. *282*, 4975–4982.

Xu, P., and Derynck, R. (2010). Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. Mol. Cell *37*, 551–566.

Xu, H., He, J.-H., Xiao, Z.-D., Zhang, Q.-Q., Chen, Y.-Q., Zhou, H., and Qu, L.-H. (2010). Liver-enriched transcription factors regulate microRNA-122 that targets CUTL1 during liver development. Hepatol. Baltim. Md *52*, 1431–1442.

• Y •

Yamada, T., Sogawa, K., Kim, J.K., Izumi, K., Suzuki, Y., Muramatsu, Y., Sumida, T., Hamakawa, H., and Matsumoto, K. (1998). Increased polyploidy, delayed mitosis and reduced protein phosphatase-1 activity associated with excess copper in the Long Evans Cinnamon rat. Res Commun Mol Pathol Pharmacol *99*, 283–304.

Yang, X., Wang, J., Dai, J., Shao, J., Ma, J., Chen, C., Ma, S., He, Q., Luo, P., and Yang, B. (2015). Autophagy protects against dasatinib-induced hepatotoxicity via p38 signaling. Oncotarget *6*, 6203–6217.

Ye, T., Wang, T., Yang, X., Fan, X., Wen, M., Shen, Y., Xi, X., Men, R., and Yang, L. (2018). Comparison of Concanavalin a-Induced Murine Autoimmune Hepatitis Models. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. *46*, 1241–1251.

Yee, A.S., Paulson, E.K., McDevitt, M.A., Rieger-Christ, K., Summerhayes, I., Berasi, S.P., Kim, J., Huang, C.-Y., and Zhang, X. (2004). The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. Gene *336*, 1–13.

Yin, C., Evason, K.J., Asahina, K., and Stainier, D.Y.R. (2013). Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. J. Clin. Invest. *123*, 1902–1910.

Yoshizuka, N., Chen, R.M., Xu, Z., Liao, R., Hong, L., Hu, W.-Y., Yu, G., Han, J., Chen, L., and Sun, P. (2012). A novel function of p38-regulated/activated kinase in endothelial cell migration and tumor angiogenesis. Mol. Cell. Biol. *32*, 606–618.

You, Q., Holt, M., Yin, H., Li, G., Hu, C.-J., and Ju, C. (2013). Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury. Biochem. Pharmacol. *86*, 836–843.

Young, A.A., Cooper, G.J., Carlo, P., Rink, T.J., and Wang, M.W. (1993). Response to intravenous injections of amylin and glucagon in fasted, fed, and hypoglycemic rats. Am. J. Physiol. *264*, E943-950.

• Z •

Zang, G.-Q., Zhou, X.-Q., Yu, H., Xie, Q., Zhao, G.-M., Wang, B., Guo, Q., Xiang, Y.-Q., and Liao, D. (2000). Effect of hepatocyte apoptosis induced by TNF-alpha on acute severe hepatitis in mouse models. World J. Gastroenterol. *6*, 688–692.

Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Karow, M., and Flavell, R.A. (2007). Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. Immunity *27*, 647–659.

Zhang, D.-G., Zhang, C., Wang, J.-X., Wang, B.-W., Wang, H., Zhang, Z.-H., Chen, Y.-H., Lu, Y., Tao, L., Wang, J.-Q., et al. (2017a). Obeticholic acid protects against carbon tetrachloride-induced acute liver injury and inflammation. Toxicol. Appl. Pharmacol. *314*, 39–47.

Zhang, H., Stolz, D.B., Chalasani, G., and Thomson, A.W. (2013). Hepatic B cells are readily activated by Toll-like receptor-4 ligation and secrete less interleukin-10 than lymphoid tissue B cells. Clin. Exp. Immunol. *173*, 473–479.

Zhang, J., Min, R.W.M., Le, K., Zhou, S., Aghajan, M., Than, T.A., Win, S., and Kaplowitz, N. (2017b). The role of MAP2 kinases and p38 kinase in acute murine liver injury models. Cell Death Dis. *8*, e2903.

Zhang, Y.-Y., Mei, Z.-Q., Wu, J.-W., and Wang, Z.-X. (2008). Enzymatic activity and substrate specificity of mitogen-activated protein kinase p38alpha in different phosphorylation states. J. Biol. Chem. *283*, 26591–26601.

Zhao, N., Hao, J., Ni, Y., Luo, W., Liang, R., Cao, G., Zhao, Y., Wang, P., Zhao, L., Tian, Z., et al. (2011). Vγ4 γδ T cell-derived IL-17A negatively regulates NKT cell function in Con A-induced fulminant hepatitis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *187*, 5007–5014.

Zheng, M., Sun, H., and Tian, Z. (2018). Natural killer cells in liver diseases. Front. Med. *12*, 269–279.

Zhou, Y., Dai, W., Lin, C., Wang, F., He, L., Shen, M., Chen, P., Wang, C., Lu, J., Xu, L., et al. (2013). Protective effects of necrostatin-1 against concanavalin A-induced acute hepatic injury in mice. Mediators Inflamm. *2013*, 706156.

Zhou, Z., Guo, F., Yi, L., Tang, J., Dou, Y., and Huan, J. (2015). The p38/mitogen-activated protein kinase pathway is implicated in lipopolysaccharide-induced microtubule depolymerization via up-regulation of microtubule-associated protein 4 phosphorylation in human vascular endothelium. Surgery *157*, 590–598.

Zhuang, Z.-H., Zhou, Y., Yu, M.-C., Silverman, N., and Ge, B.-X. (2006). Regulation of Drosophila p38 activation by specific MAP2 kinase and MAP3 kinase in response to different stimuli. Cell. Signal. *18*, 441–448.

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

ANNEXE

CHAPTER

8 Incomplete cytokinesis/binucleation in mammals: the powerful system of hepatocytes

M. Fortier[*,§,¶], **S. Celton-Morizur**[*,§,¶,1,a], **C. Desdouets**[*,§,¶,1,a]

[*]*Inserm, U1016, Paris, France*

[§]*CNRS, UMR 8104, Paris, France*

[¶]*Paris Descartes University, Paris, France*

[1]*Corresponding authors: E-mail: severine.morizur@inserm.fr; chantal.desdouets@inserm.fr*

CHAPTER OUTLINE

Introduction **120**

1. Experimental Procedures **122**

1.1 In Situ Immunostaining 122

1.1.1 Liver harvesting 122

1.1.2 Liver section 122

1.1.3 Cellular ploidy analysis 123

1.1.4 Cytokinesis process analysis 125

1.2 Primary Culture of Hepatocytes 126

1.2.1 Solution preparation 127

1.2.2 Liver perfusion 127

1.2.3 Primary hepatocyte isolation 129

1.2.4 Cell plating and culture conditions 130

1.2.5 Analysis of proliferative status 131

1.2.6 Analysis of mitosis and cytokinesis progression 133

Conclusion **139**

Acknowledgments **139**

Supplemendary Data **139**

References **140**

[a]These authors contribute equally.

Methods in Cell Biology, Volume 137, ISSN 0091-679X, http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.04.006

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abstract

Polyploidy, the state of having greater than a diploid DNA content (tetraploid, octoploid, etc.) is a characteristic feature of mammalian hepatocytes and accompanies late fetal development and postnatal maturation of the liver. During the weaning period, diploid hepatocytes can engage either into normal cell division cycle giving rise to two diploid hepatocytes or follow a scheduled division program characterized by incomplete cytokinesis. In that case, diploid hepatocytes undergo mitosis, but do not form a contractile ring. Indeed, cleavage-plane specification is never established, because of the deficiencies of actin cytoskeleton reorganization. Furthermore, microtubules fail both to contact the cortex and to deliver their molecular signal, preventing localization and activation of RhoA. Therefore, cytokinesis aborts and a binucleate tetraploid liver cell is generated, which subsequently plays a pivotal role in liver progressive polyploidization. In this chapter, we describe detailed protocols to monitor hepatocyte proliferation and cytokinesis process by in situ and dynamic ex vivo approaches.

INTRODUCTION

Polyploidy, also known as whole-genome amplification refers to organisms containing more than two sets of chromosomes (eg, 4n, 8n) (Gentric & Desdouets, 2014; Pandit, Westendorp, & de Bruin, 2013). This phenomenon is commonly observed in plants, fungi, insects, fishes, and amphibians (Otto & Whitton, 2000). The additional set (or sets) of chromosomes may originate from the same individual ("autopolyploid") or from the hybridization of two different species ("allopolyploid"). Although diploid is the normal status for mammalian cells, various studies have demonstrated during the past decades a major implication of "diploid−polyploid conversion" during physiopathological processes in different tissues. Thus, cardiomyocytes, muscle cells, platelet progenitor megakaryocytes, and hepatocytes develop a certain degree of polyploidy during their normal life cycle. Importantly, polyploid cells can be also formed in response to stress and injury [eg, uterine smooth muscle cells during pregnancy (van der Heijden & James, 1975) and vascular smooth muscle cells during hypertension (Hixon et al., 2000)] and during the tumorigenesis process [eg, colon, esophagus, cervical cancer (Ganem, Storchova, & Pellman, 2007; Storchova & Pellman, 2004)]. The biological properties of polyploid cells remain obscure but, in certain tissues, it has been already discovered that polyploidization leads to genetic diversity and also confers specific cell function (Duncan et al., 2012; Gentric & Desdouets, 2014).

As previously described, polyploidy is a characteristic feature of mammalian hepatocytes. Polyploidy characterizes up to 90% of adult hepatocytes in mice (Duncan et al., 2010) and around 40% in humans (Toyoda et al., 2005). Polyploid hepatocytes are defined by the number of nuclei per cell (cellular ploidy) as well as the DNA content of each nucleus (nuclear ploidy) (Fig. 1) (Gentric & Desdouets, 2015). Polyploid hepatocytes can be tetraploid [eg, binucleate with two diploid (2n) nuclei or mononucleate with a single tetraploid (4n) nucleus] or octoploid [eg, binucleate with two tetraploid (4n) nuclei or mononucleate with a single octoploid (8n) nucleus]. Hepatocyte polyploidization is an age-dependent process. Hepatocytes are almost

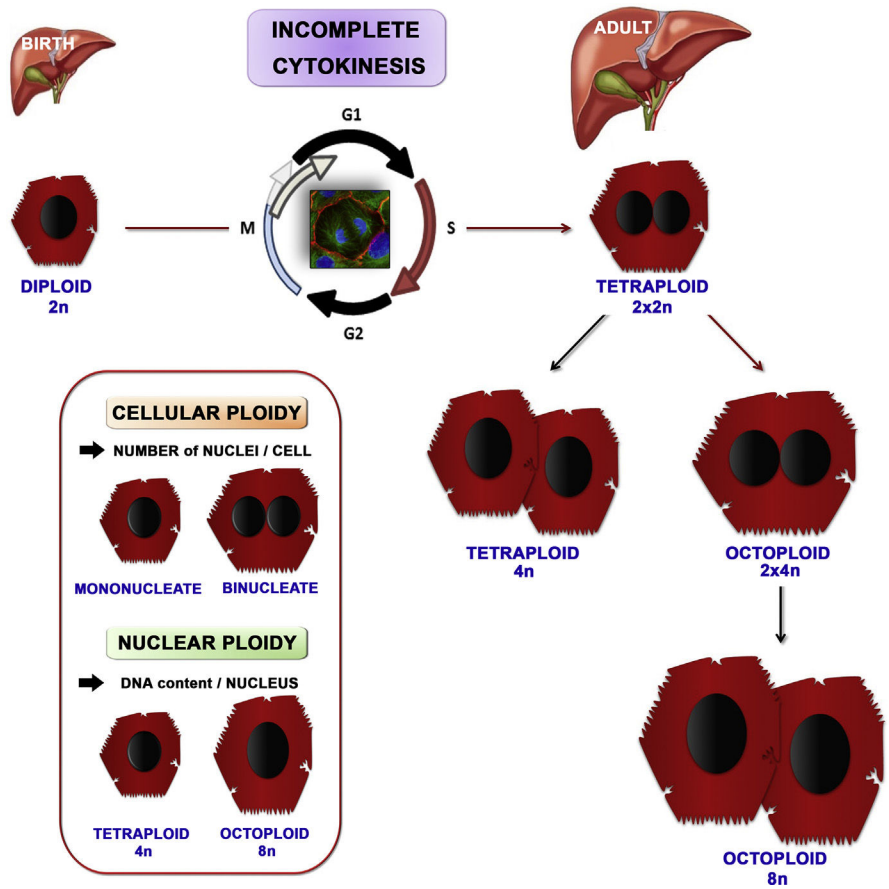


FIGURE 1 Polyploidization during postnatal liver growth.

At birth, hepatocytes are exclusively diploid (mononucleate 2n). During postnatal liver development after weaning, mononucleate 2n hepatocytes can engage either into normal cell division cycle giving rise to two mononucleate 2n hepatocytes or follow an adaptive cell cycle with cytokinesis failure (*red arrow*) giving rise to one binucleate tetraploid ($2 \times 2n$) hepatocyte. By this process, progressive polyploidization takes place in the liver parenchyma and tetraploid and octoploid cell classes with one or two nuclei are formed. Polyploid hepatocytes are then characterized by the number of nuclei per cell (cellular ploidy) as well as the DNA content of each nucleus (nuclear ploidy).

diploid in young animals and polyploid contingents increase with age (Guidotti et al., 2003; Kudryavtsev, Kudryavtseva, Sakuta, & Stein, 1993). The primary mechanism for hepatocyte polyploidization is incomplete cytokinesis (Guidotti et al., 2003; Margall-Ducos, Morizur-Celton, Couton, Bregerie, & Desdouets, 2007). First, diploid hepatocytes (2n) accomplish adequate karyokinesis but fail to complete cytokinesis, generating binucleate tetraploid daughter cells ($2 \times 2n$). If binucleate tetraploid

hepatocyte reenters the cell cycle, this cell will either undergo cytokinesis, leading to the genesis of two mononucleate tetraploid hepatocytes (4n), or fail again, leading to the genesis of a binucleate octoploid hepatocyte (2 × 4n) (Fig. 1). We demonstrated in 2009 in rodents that the initiation of incomplete cytokinesis events and the subsequent appearance of binucleated tetraploid cells in the liver are strictly controlled by the suckling-to-weaning transition (Celton-Morizur, Merlen, Couton, Margall-Ducos, & Desdouets, 2009). Furthermore, we showed that the disruption of cytokinesis program in hepatocytes is due to an absence of cytoskeleton reorganization: actin cytoskeleton is not reorganized into the division plane in anaphase–telophase transition, then impairing cell elongation. In concert, microtubules fail to contact the cortex and therefore, molecular signals, essential for furrow induction (eg, Aurora B and polo-like kinase 1), are not correctly delivered. Consequently, activation of the RhoA GTPase (the major cytokinesis orchestrator) to the central cortex is impaired, leading to the genesis of binucleate progeny (Margall-Ducos et al., 2007).

Here, we present different methods to assess hepatocyte proliferation and cytokinesis process both in vivo by in situ immunostaining and ex vivo by using primary culture of hepatocytes, which is a very powerful tool to investigate ex vivo the process of tetraploidization.

1. EXPERIMENTAL PROCEDURES

1.1 IN SITU IMMUNOSTAINING

1.1.1 Liver harvesting

- *Materials*
  - Rodents (C57BL/6NRj mice—RjHan:Wistar rats from Janvier Labs)
  - 1X phosphate buffered saline (PBS)
  - Formalin (Carlo Erba reagents, 415691)
  - 70% Ethanol
  - Tissue-Tek VIP (Sakura)

Mice or rats are housed under standard light/dark conditions and receive pelleted food (weaning) and water ad libitum. Animals are weaned at 19 days after birth.

Animals are killed by cervical dislocation (mice) or by lethal injection of anesthetic (rats). Their livers are harvested and incubated in 4% phosphate-buffered formalin during 12 h. They are washed once in 70% ethanol before to be embedded in paraffin via Tissue -Tek VIP.

1.1.2 Liver section

- *Materials*
  - Microtome
  - Superfrost Ultra Plus Adhesion Slides (ThermoScientific)

- Water bath
- 55°C Incubator

- *Methods*

1. Section paraffin blocks at a thickness of 10 μm on a microtome and float on a 37°C water bath containing distilled water.
2. Transfer the sections onto a Superfrost Ultra Plus Adhesion slide. Slides dry overnight in a 55°C incubator. They can then be used immediately or stored at room temperature for future experiments. *However, we recommend not to use the slides more than 1 week after the sectioning.*
3. Deparaffinize sections in xylene 3 × 5 min.
4. Hydrate with 100% ethanol (2 × 5 minutes) and transfer once through 90% (1 × 5 min) and then 80% alcohol (1 × 5 minutes). Finally, rinse in distilled water for 5−10 min. Keep the slides in the water until ready to perform antigen retrieval. *From this step, slides should not be allowed to dry as it could induce nonspecific antibody binding and high background staining.*

1.1.3 Cellular ploidy analysis (Fig. 2)

To investigate hepatocyte cellular ploidy, colabeling of nuclear (Hoechst) and plasma membrane (β-catenin) which allows to discriminate mononucleate and binucleate hepatocytes are performed.

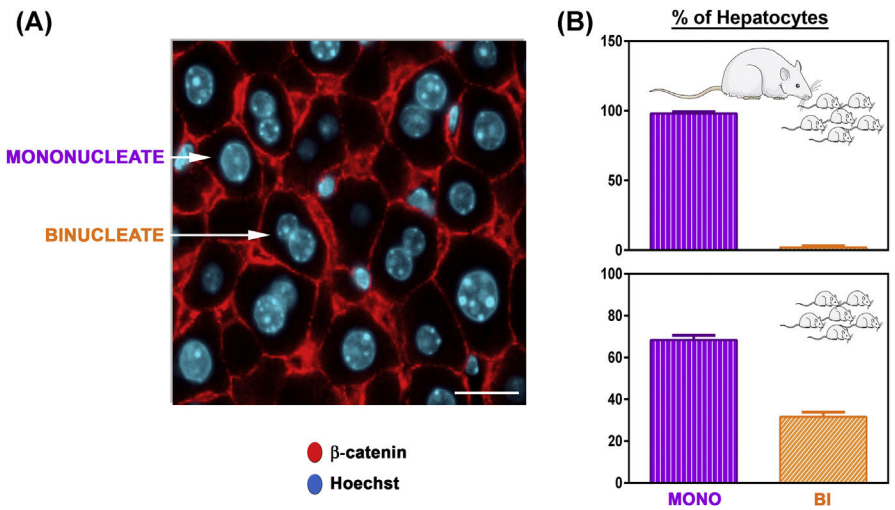


FIGURE 2 Cellular ploidy analysis.

(A) Images of liver sections after double staining with β-catenin (plasma membrane labeling, *red*) and Hoechst (nucleus, *blue*) to discriminate between mononucleate and binucleate hepatocytes. Scale bar: 10 μm. (B) Illustration of the percentage of mononucleate and binucleate hepatocytes observed in the liver 19 days suckling rats (upper panel) and 23 days weaned rats (lower panel).

- *Materials*
  - Pressure cooker (Eurobio)
  - Epitope retrieval solution: Tris 0.1M/0.1% Tween-20, pH 9.4
  - Hydrophobic pen
  - Antibody diluent, Dako REAL (Dako, S2022)
  - 1X PBS
  - 1X phosphate buffered saline tween (PBS-T): PBS with 0.1% Tween-20
  - Mouse anti−β-catenin antibody (BD Transduction Laboratories, 610154)
  - Goat anti−mouse IgG (H + L) secondary antibody, Alexa Fluor 594 conjugate (Molecular Probes, A11032)
  - Hoechst 33258 at1 μg/mL (Sigma, B2883)
  - Fluorescent mounting medium (Dako, S3023).
- *Methods*

Labeling	β-Catenin
Blocking solution	2% Goat serum In Dako REAL 1 h at room temperature
Primary antibody incubation	Anti−β-catenin antibody 1/200 in Dako REAL 1 h at 37°C
Secondary antibody incubation	Anti−mouse Alexa Fluor 594 1/500 in Dako REAL 1 h at 37°C

1. Transfer the slides in epitope retrieval solution and place them in a pressure cooker for 15 min at 95°C. At the end of the run, wait 20 min and then transfer slides in a bath of distilled water, during 10 min.
2. Place the slides in a bath of 1X PBS solution for 2 min.
3. Delimitate an interest zone using hydrophobic pen on the slides.
4. Add blocking solution on the delimited zone during the recommended time.
5. Aspirate the blocking solution and add β-catenin primary antibody solution.
6. Rinse with 1X PBS-T thrice.
7. Add secondary antibody solution.
8. Rinse with 1X PBS-T thrice.
9. Incubate in Hoechst solution (diluted at 1/500 in 1X PBS-T) during 20 min to counterstain nuclei.
10. One wash with 1X PBS-T.
11. Add fluorescent mounting medium and a glass coverslip. Seal with nail polish.

- *Data analysis*

Z-axis stacks were collected using a piezoelectric device mounted at the base of a 20× magnification, on a Olympus BX63F microscope and an ORCA-Flash4.0 LT C11440-42U Hamamatsu camera controlled by Metamorph software (Molecular Device). A total of 40 planes (0.2-μm slice) are captured and compiled as single

two-dimensional projections using ImageJ software. All images are imported into Adobe Photoshop CS for contrast manipulation and figure assembly.

For diploid and tetraploid hepatocyte counting experiments, at least 15 randomly chosen fields of liver tissue should be imaged (more than 2500 cells analyzed).

Fig. 2 shows an example of in situ β-catenin/Hoechst staining (Panel A) and the result of cellular ploidy analysis between suckling and weaned rats (Panel B).

1.1.4 Cytokinesis process analysis (Fig. 3)

- *Materials*
  - Pressure cooker
  - Epitope retrieval solution: Tris 0.1 M/0.1% Tween-20, pH 9.4
  - Hydrophobic pen
  - Antibody diluent, Dako REAL
  - 1X PBS
  - 1X PBS-T: PBS with 0.1% Tween-20
  - Mouse anti−β-tubulin Tub 2.1 antibody (Sigma, T4026)
  - Goat anti−rabbit IgG (H + L) secondary antibody, Alexa Fluor 488 conjugate (Molecular Probes, A11034)
  - Hoechst 33258 at 1 μg mL
  - Fluorescent mounting medium
- *Methods*

Labeling	β-Tubulin
Blocking solution	2% Goat serum In Dako REAL 1 h at room temperature
Primary antibody incubation	Anti−β-tubulin antibody 1/200 in Dako REAL 1 h at 37°C
Secondary antibody incubation	Anti−mouse Alexa Fluor 488 1/500 in Dako REAL 1 h at 37°C

Proceed in the same manner as described in Section 1.1.3.

Notes

This staining could also be coupled with β-catenin staining. In that case, we recommend to first use anti−β-tubulin antibody and its specific secondary antibody and then anti−β-catenin antibody and its secondary antibody.

- *Data analysis*

Images are taken using a Nikon Statif Eclipse E600 microscope with 40× magnification, 1.4-0.7 NA PL-APO objectives, a DXM1200 cooled charge-coupled-device (CCD) camera (Nikon), and ACT-1 (Universal Imaging). At least 50 cytokinesis events per animal should be randomly imaged.

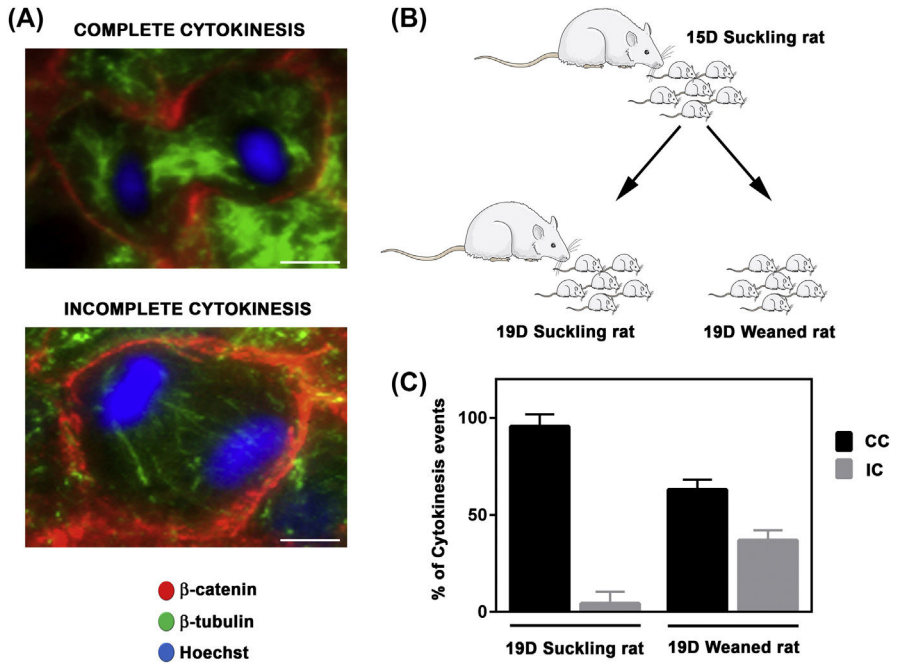


FIGURE 3 Analyzing cytokinesis failure events during postnatal liver growth.

(A) Immunostaining of liver sections to detect cytokinesis figures: β-catenin (plasma membrane labeling, *red*), β-tubulin (microtubule labeling, *green*) and condensed chromatin staining (Hoechst, *blue*). Upper panel illustrates normal cytokinesis process with ingression of cellular membrane and formation of a central midbody. Lower panel illustrates incomplete cytokinesis process with the absence of furrow ingression and a round cellular shape. Scale bar: 5 μm. (B and C) Illustration of the percentage of complete cytokinesis (CC) and incomplete cytokinesis (IC) observed in suckling (aged 19 days) and in weaned rats (aged 19 days, weaned at 15 days).

Adapted from Celton-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D., Margall-Ducos, G., & Desdouets, C. (2009). The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. The Journal of Clinical Investigation, 119*(7), 1880–1887.*

Fig. 3 shows examples of in situ β-tubulin/β-catenin/Hoechst staining (Fig. 3A) and the percentage of complete/incomplete cytokinesis events (Fig. 3B) between suckling and weaned rat.

1.2 PRIMARY CULTURE OF HEPATOCYTES

Primary culture, usually isolated from whole liver (animal/human) by a two-step process involving collagenase digestion, is commonly used to investigate proliferative status and cell cycle progression of hepatocytes. This ex vivo system provides a great tool to better assess the role of hepatocytes in pathophysiological processes of the liver.

1.2.1 Solution preparation

Solution	Product	Reference	Final Concentration
Coating solution	Collagen from calf skin 1 mg/mL	Sigma C8919	0.4 mg/mL
	Glacial acetic acid 100%	—	0.1%
	H_2O	Deionized/ sterilized water	
Perfusion solution	NaCl	Sigma S5886	137 mM
	KCl	Sigma P5405	2.68 mM
	Na_2HPO_4	Sigma S5136	232 μM
	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinee-thanesulfonic acid	Sigma H6147	10 mM
	Ethylenedia-minetetraacetic acid	Sigma E3889	0.5 mM
	H_20	Deionized/ sterilized water	
	pH	—	7.65
Liver digest solution	Collagenase from *Clostridium histolyticum*	Sigma C5138	0.05%
	$CaCl_2.2H_2O$	Sigma C7902	10 mM
	Perfusion solution pH 7.65	-	
Hepatocyte culture medium	William's E medium, GlutaMAX supplement	Gibco 32551-020	
	Penicilin/streptomycin	Gibco 15140-122	100 U/mL
	Fungizone antimycotic B	Gibco 15290-026	100 μg/mL
	Insulin	Sigma I0516	4 μg/mL
	Bovin serum albumin 7.5%	Sigma A8412	0.1%
	Dexamethasone	Sigma D2915	25 nM
Mitogenic medium	Epidermal growth factor	Sigma E4127	50 ng/mL
	Pyruvate sodium	Sigma P4562	20 mM
	Hepatocyte culture medium	-	

1.2.2 Liver perfusion (Fig. 4)

- *Materials*
  - Anesthetic
  - Ethanol 70%
  - Peristaltic pump
  - Water bath at 37°C
  - Dissecting instruments: scissors, tweezers

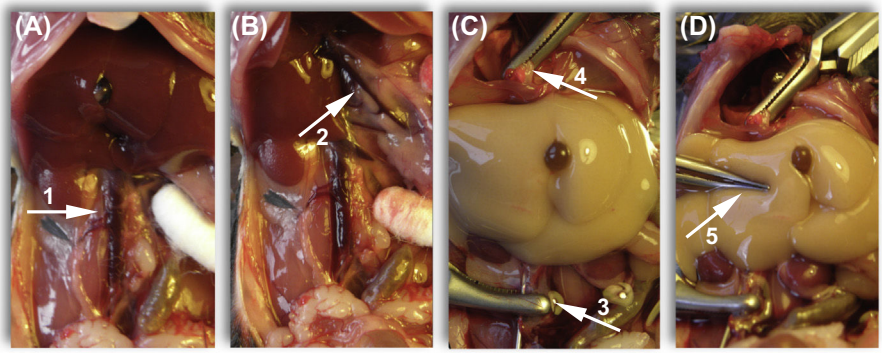


FIGURE 4 Key steps of liver perfusion.

(A) Opening of the abdomen and cleaning of cava vein (*arrow 1*). (B) Organ localization before insertion of the needle with the highlighting of portal vein (*arrow 2*). (C) White and inflated liver during washing step. Two clamps are placed, one at needle and cava vein (*arrow 3*) and the second at the sus-hepatic vein (*arrow 4*). (D) Digestion step: tweezer leaving a mark on liver (*arrow 5*).

- Clamps (2)
- Surgical infusor (B.BRAUN Intrafix Primeline I.S. Spinlock, 4064009)
- Needle (B.BRAUN Epicranien Venofix AAIG 0,5 G25, 4056370)
- Compresses and Q-tip
- Perfusion solution
- Digestion solution
- Hepatocyte culture medium
- 10-cm dish

- *Methods*

Per animal, 50 mL of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) solution, 25 mL of digestion solution, and 50 mL of hepatocyte culture medium at 37°C are required.

1. Install perfusion system with surgical infusor, needle, and peristaltic pump. Prime the circuit with HEPES solution at 3.5 mL/min flow rate (mouse) or 5 mL/min (rat).
2. Anesthetize the animal.
3. Open the animal from the lower abdomen to the rib cage.
4. Shift the intestine on the right of the animal to highlight the inferior cava vein and portal vein.
5. Remove gently the conjunctive tissue of the inferior cava vein with Q-tip.
6. Turn off the peristaltic pump.
7. Insert needle into the inferior cava vein and clamp the vein and the needle.
8. Open the rib cage and clamp the sus-hepatic vein.

9. Cut the portal vein.
10. Turn on the peristaltic pump to deliver the perfusion solution inside the liver. The blood leaves progressively the hepatic tissue and the chelating agent ethylenediaminetetraacetic acid in the perfusion solution progressively removes hepatic calcium disrupting cell−cell tight junctions.
11. Wash the liver for 10 min with the perfusion solution (the liver should be white and inflated).
12. Change the perfusion solution with the digestion solution. Collagenase will help to separate the hepatocytes from the liver stroma by digestion of the extracellular matrix. The liver continues to inflate, and then it spreads.
13. Stop the digestion (around 4 min). To appreciate liver digestion efficiency, press the liver with a tweezer, this should induce a mark like a scar.
14. Take the liver and place it in a 10 cm-diameter culture dish filled with the hepatocyte culture medium (prewarmed at 37°C).
15. Open the Glisson capsule with a tweezer and release hepatocytes in the medium by shaking the liver.

Notes

The digestion efficiency depends on the quality of the collagenase. So, before experiments, you need to evaluate the collagenase activity (digestion and cellular viability) by testing different batches.

1.2.3 Primary hepatocyte isolation

- *Materials*
  - Centrifuge
  - Sterile cell strainers: 70 and 40 μm diameter (BD Falcon)
  - Water bath at 37°C
  - Hepatocyte culture medium
  - Fetal calf serum (FCS, Gibco)
- *Methods*

Before manipulation, prewarm the hepatocyte culture medium and FCS in the water bath to obtain 37°C solutions.

1. Recover cells from the dish to a 50-mL tube by filtering them through a 70-μm cell strainer. This step helps to remove undigested tissue and connective tissue.
2. Centrifuge the 50-mL tube at 400 rpm during 3 min at room temperature.
3. Discard the supernatant (containing nonparenchymal cells) and gently add 10 mL of the hepatocyte culture medium to the pellet. Rotate slowly the tube manually to gently resuspend the pellet. Complete with 40 mL of hepatocyte culture medium.
4. Repeat steps 2 and 3 twice.
5. Remove the supernatant, and add between 10 and 20 mL (according to the size of the pellet) of hepatocyte culture medium supplemented with 10% FCS.
6. Filter the suspended cells through a 40-μm cell strainer.

7. Evaluate the cellular yield and viability with trypan blue exclusion assay.
   Notes

   In order to analyze cell cycle parameters, hepatocyte viability has to be $\geq$85%.

1.2.4 Cell plating and culture conditions

- *Materials*
  - 3.5 and 6 cm dishes (BD Falcon)
  - Round glass coverslip
  - Coating solution (collagen from calf skin, Sigma C8919)
  - 1X PBS
  - Water bath at 37°C
  - Hepatocyte culture medium at 37°C
  - FCS at 37°C
  - Epidermal growth factor (EGF) (Sigma, E4127), 50 ng/mL
  - Sodium pyruvate (Sigma, P4562), 20 mM
  - Trypan blue
  - Incubator at 37°C and 5% CO_2 atmosphere
- *Methods*

Dishes should first be coated with an extracellular matrix (collagen-coating solution) at 37°C for at least 30 min, washed with 1X PBS twice, and then dried. For the 3.5-cm dishes, place a round glass coverslip inside before coating. This coverslip will be used for videomicroscopy experiment (see Section 1.2.6.2).

Coating step will provide hepatocyte attachment and maintenance of the hepatic phenotype. Consequently, hepatocyte primary culture in that context can be considered as a 2D culture.

1. Display:
   a. 600,000 (mouse) to 800,000 (rat) isolated hepatocytes in 2.5 mL of hepatocyte culture medium +10% FCS, in 6-cm dishes.
   b. 250,000 (mouse) to 300,000 (rat) isolated hepatocytes in 1.5 mL of hepatocyte culture medium +10% FCS, in 3.5-cm dishes.

   To evaluate plating quality, mortality and cell aggregates should be taken into account.
2. Place plates in 37°C incubator with 5% CO_2.
3. After complete adhesion of the hepatocytes (about 4 h), wash the dishes with fresh serum-free hepatocyte culture medium twice, to remove dead cells.
4. Finally, place plates in 37°C incubator with 5% CO_2 in culture medium overnight.
5. Change medium every morning (*First point: T12*) with mitogenic culture medium (supplemented with EGF and pyruvate).

1.2.5 Analysis of proliferative status (Fig. 5)

After collagenase perfusion, hepatocytes exit quiescence and enter into the G1 phase to the late G1 restriction checkpoint (Loyer et al., 1996). Mitogenic treatment with EGF and pyruvate allows hepatocytes to bypass this checkpoint and to progress synchronously into S phase. At 36–48 h of plating, a peak in phase S is reached and a maximal mitotic index is observed at 60 h (See Fig. 5A).

1.2.5.1 Cell fixation

- *Materials*
  - 1X PBS
  - -20°C Methanol
  - -20°C Ethanol 75%–acetic acid 25%
- *Methods*

Labeling	Fixation Solution	Timing for Fixation
Bromodeoxyuridine	Ethanol 75%–acetic acid 25%	20 min/–20°C
Phospho histone H3	Methanol	6 min/–20°C

1. Place dishes on ice.
2. Aspirate the medium and add 1X PBS.
3. Rinse a second time with 1X PBS.
4. Add 2 mL of cold fixer according to the envisaged labeling.
5. Place dishes at −20°C during indicated time.
6. Discard the fixator and rinse thrice with 1X PBS, and finally display 2 mL of 1X PBS. Fixated dishes could be used immediately or be stored at 4°C for 1 week.

1.2.5.2 Immunostaining

- *Materials*
  - Hydrophobic pen
  - 1X PBS
  - 1X PBS-T
  - 5-Bromo-2′-deoxy-uridine labeling and detection kit I (Roche, 11296736001) containing:
    - Bromodeoxyuridine (BrdU) labeling medium (1000X)
    - Anti-BrdU antibody
    - Anti–mouse-Ig-fluorescein antibody
    - Buffer 3
  - Antibody diluent, Dako REAL
  - Rabbit anti-phospho histone H3 (anti-PHH3) antibody (Millipore, 06-570)

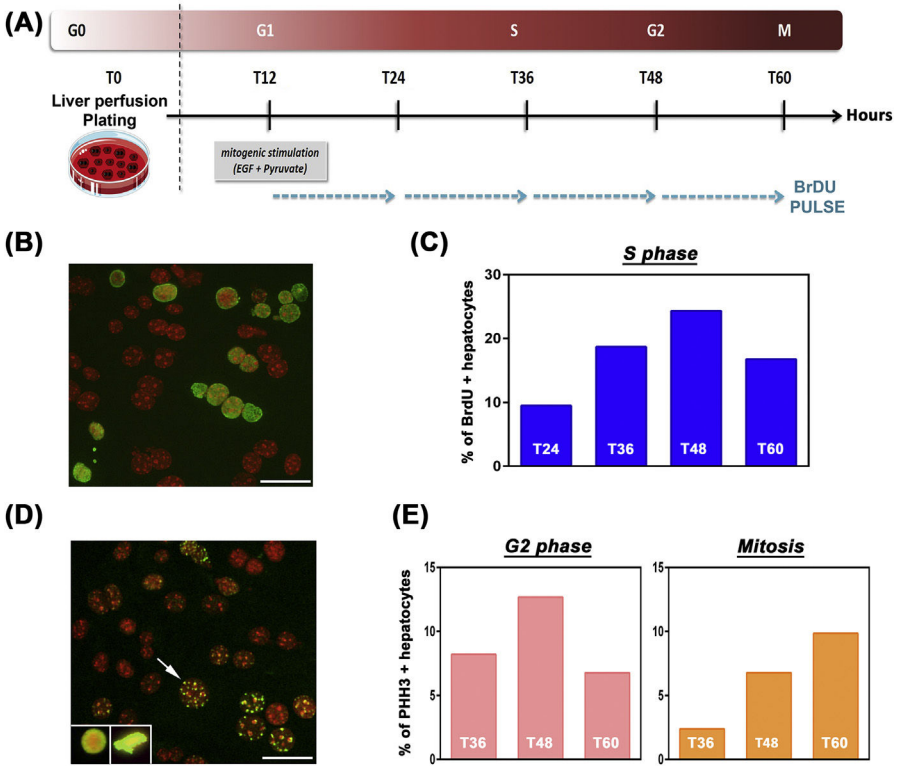


FIGURE 5 Primary culture and hepatocyte proliferation analysis.

(A) Schematic protocol of primary hepatocyte culture. Bromodeoxyuridine (BrdU) is incorporated in culture medium during time course kinetic (at T12 h, T24 h, T36 h, T48 h) for a duration of 12 h. T0: Liver perfusion and hepatocytes plating; T12 h: 12 h after plating. (B) Immunostaining of primary hepatocytes with anti-BrdU (*green*) and Hoechst (*red*) 36 h after plating. Scale bar: 15 μm. (C) Quantitative representation of BrdU-positive hepatocytes during the time course of the primary culture (T24 h, T36 h, T48 h, T60 h). The proliferative profile of hepatocytes describes a Gaussian curve. (D) Immunostaining of primary hepatocytes with anti-PHH3 (*green*) and Hoechst (*red*) 48 h after plating. Hepatocytes in G2 phase present dot labeling (*arrows*) and hepatocytes in mitosis have a dense staining (windows). Scale bar: 15 μm. (E) Quantitative representation of PHH3-positive G2 (left panel) and mitotic (right panel) hepatocytes during the time course of the primary culture (T36 h, T48 h, T60 h).

- Goat anti−rabbit IgG (H + L) secondary antibody, Alexa Fluor 488 conjugate (Molecular Probes, A11034)
- Hoechst 33258 (1 μg/mL)
- Fluorescent mounting medium

- *Methods*

To detect BrdU incorporation in hepatocyte nuclei, 1X BrdU labeling medium is added during culture at key timing (T12, T24, T36, and T48 h after plating; Fig. 5A) for a duration of 12 h.

Labeling	Bromodeoxyuridine (BrdU) (S Phase)	Phospho Histone H3 (PHH3) (G2/M Phases)
Blocking solution	2% Goat serum +10% bovine serum albumin Diluted in 1X TBS–0.1% Tween-20 30 min at room temperature	2% Goat serum Diluted in Dako REAL 1 h at room temperature
Primary antibody incubation	Anti-BrdU antibody Diluted at 1/50 in Buffer 3 30 min at 37°C	Anti-PHH3 antibody Diluted at 1/200 in Dako REAL Overnight at 4°C
Secondary antibody incubation	Anti–mouse-Ig-fluorescein antibody Diluted at 1/50 in Buffer 3 30 min at 37°C	Anti–rabbit Alexa Fluor 488 Diluted at 1/500 in Dako REAL 1 h at 37°C

1. Delimit a rounded area in the fixated dish using a hydrophobic pen.
2. Add blocking solution on the delimited zone during the recommended time.
3. Aspirate the blocking solution and add appropriate primary antibody solution.
4. Rinse with 1X PBS-T thrice.
5. Add appropriate secondary antibody solution.
6. Rinse with 1X PBS-T thrice.
7. Incubate in Hoechst solution (diluted at 1/500 in 1X PBS-T) to counterstain nuclei.
8. One wash with 1X PBS-T.
9. Add fluorescent mounting medium and a glass coverslip. Seal with nail polish.

- *Data Analysis*

Fluorescent images are taken as described in Section 1.1.4. To appreciate hepatocyte proliferation, BrdU- and PPH3-positive hepatocytes are counted during the time course kinetic.

Fig. 5 illustrates an example of the global proliferative status of hepatocytes isolated from the liver of 1-month-old mouse.

1.2.6 Analysis of mitosis and cytokinesis progression (Figs. 6 and 7)

In mammals, cytokinesis is a fundamental process that requires complex changes in cell shape and a profound reorganization of the cellular cytoskeleton (D'Avino, Giansanti, & Petronczki, 2015). Astral microtubules emanating from the spindle poles and central spindle microtubules between separating chromosomes are essential for the activation of equatorial cortical regions (D'Avino, Savoian, & Glover, 2005). Indeed, numerous signaling proteins (MKLP1, MgcRacGAP, the

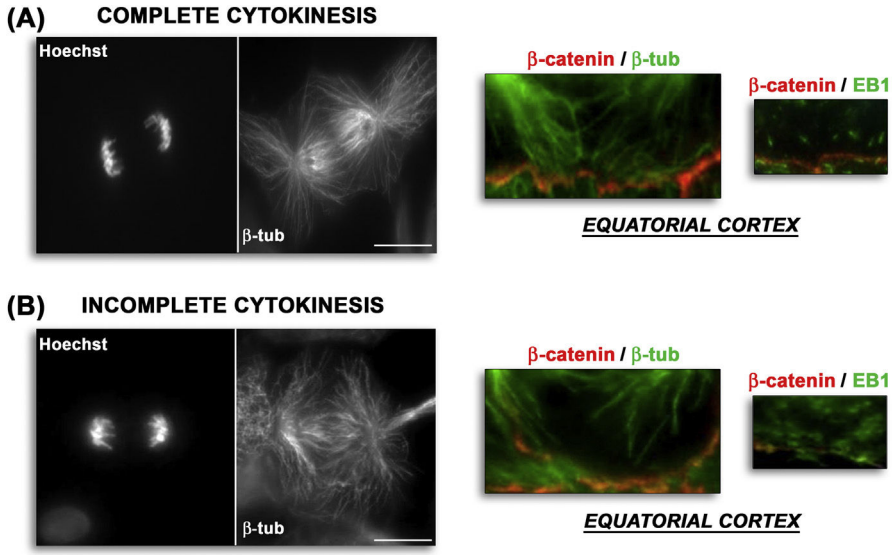


FIGURE 6 Analysis of microtubules dynamic in primary hepatocytes.

(A) During complete cytokinesis event, immunostaining for β-tubulin indicates the presence of antiparallel microtubules (the central spindle) and microtubules toward the cell cortex in the furrow and polar regions, during anaphase. At the central cortex, astral microtubules are correctly anchored and EB1 localization to the microtubules tips is weakly observed. Scale bar: 10 μm. (B) During incomplete cytokinesis event, hepatocytes present a disrupted central spindle and astral equatorial microtubules, as well as reduced astral polar microtubules. As astral microtubules fail to contact the equatorial cortex, EB1 is still present on microtubule tips. Scale bar: 10 μm.

Adapted from Margall-Ducos, G., Morizur-Celton, S., Couton, D., Bregerie, O., & Desdouets, C. (2007). Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. Journal of Cell Science, 120*(20), 3633–3639.*

passenger protein Aurora B, and the Rho GTPase exchange factor ECT2) are involved in relaying information from the spindle to the cortex and ultimately anchor RhoA, the master regulator of contractile ring formation (Eggert, Mitchison, & Field, 2006). Activation of RhoA GTPase at the central cellular cortex promotes rapid remodeling of the cortical actomyosin cytoskeleton (Bement, Benink, & von Dassow, 2005) (Yuce, Piekny, & Glotzer, 2005) (Kamijo et al., 2006) (Mierzwa & Gerlich, 2014) (Jordan & Canman, 2012).

To define more precisely molecular mechanisms regulating incomplete cytokinesis process in hepatocytes, immunostaining of these different actors can be performed in primary cultured hepatocytes.

1.2.6.1 Analysis of microtubules dynamic

Astral and central spindle microtubules are essential to deliver spatially restricted signals to the cortex and consequently to promote cleavage plane specification

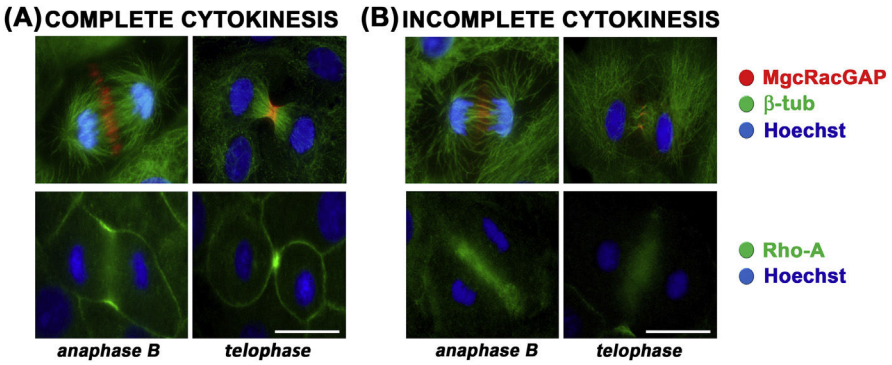


FIGURE 7 Immunostaining of cytokinesis players in primary hepatocytes.

(A) During complete cytokinesis process (left panel), MgcRacGAP (*red*, upper panel) is localized during anaphase both on the central spindle and on astral equatorial microtubules. During telophase, MgcRacGAP is concentrated at the midbody. RhoA (*green*, lower panel) accumulates at the equatorial cortex in early telophase in hepatocytes that complete cytokinesis; then it concentrates at the cleavage furrow and finally at the midbody. Scale: 10 μm. (B) During incomplete cytokinesis process (right panel), MgcRacGAP (*red*, upper panel) is observed on the remaining interdigitating microtubules in anaphase B and telophase but is never localized on unattached astral equatorial microtubules. Furthermore, RhoA (*green*, lower panel) does not correctly localize at the equatorial cortex, in which astral microtubules concentration is decreased. Scale: 10 μm.

Adapted from Margall-Ducos, G., Morizur-Celton, S., Couton, D., Bregerie, O., & Desdouets, C. (2007). Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. Journal of Cell Science, 120*(20), 3633–3639.*

(D'Avino et al., 2005). During normal cytokinesis, astral microtubules become stabilized upon contacting the cortex (Burgess & Chang, 2005). In that case, EB1, a microtubule tips protein only associated with elongating microtubules (Strickland, Wen, Gundersen, & Burgess, 2005), is rarely observed in this cortical region.

Then, detailed analysis of the microtubule network represents a very dynamical way to investigate the cytokinesis process in hepatocytes.

- *Material*
  - Hydrophobic pen
  - Antibody diluent, Dako REAL
  - 1X PBS
  - 1X PBS-T: PBS with 0.1% Tween-20
  - Mouse anti−β-catenin antibody (BD Transduction Laboratories, 610154)
  - Mouse anti−β-tubulin antibody (Sigma, T4026)
  - Mouse anti−EB1 antibody (BD Transduction Laboratories, 610535)

- Goat anti−mouse IgG (H + L) secondary antibody, Alexa Fluor 594 conjugate (Molecular Probes, A11032)
- Goat anti−rabbit IgG (H + L) secondary antibody, Alexa Fluor 488 conjugate (Molecular Probes, A11034)
- Hoechst 33258 (1 μg/mL)
- Fluorescent mounting medium

- *Methods*

Labeling	Fixation Solution	Timing for Fixation	Primary Antibody Dilution	Secondary Antibody Dilution
B-Catenin	Methanol	5 min/−20°C	1/200	Mouse Alexa Fluor 594 1/500
B-Tubulin	Methanol	5 min/−20°C	1/100	Mouse Alexa Fluor 488 1/500
EB1	Methanol	5 min/−20°C	1/100	Mouse Alexa Fluor 488 1/500

1. Fix cells according to the used primary antibody.
2. Remove fixator and add 1X PBS. At this step, dishes can be kept at 4°C until 1 week.
3. Remove 1X PBS and replace it by 1X PBS-T for 5 min.
4. Remove 1X PBS-T and delimitate an interest zone using Dako pen.
5. Add blocking solution (as described in Section 1.2.5.2) on the delimited zone during the recommended time.
6. Aspirate the blocking solution and add primary antibody solution.
7. Rinse with 1X PBS-T thrice.
8. Add secondary antibody solution.
9. Rinse with 1X PBS-T thrice.
10. Incubate in Hoechst solution (diluted at 1/500 in 1X PBS-T) for 20 min to counterstain nuclei.
11. Wash with 1X PBS-T.
12. Add fluorescent mounting medium and a glass coverslip. Seal with nail polish.

- *Data Analysis*

Single-plane fluorescent images are taken as described in Section 1.1.4.

Fig. 6 illustrates the differences observed in the microtubules network in hepatocytes entering normal cytokinesis and hepatocytes which fails cytokinesis.

Indeed, in hepatocytes that do not complete cytokinesis, microtubules network behavior is normal until early anaphase; thereafter, astral microtubules fail to contact the equatorial cortex and EB1 staining is still present on microtubule tips, illustrating the absence of cortical anchorage.

1.2.6.2 Immunostaining of cytokinesis key players

- *Material*
  - Hydrophobic pen

- Antibody diluent, Dako REAL
- 1X PBS
- 1X PBS-T
- Mouse anti−AIM-1 antibody (BD Transduction Laboratories, 611083)
- Mouse anti−MgcRacGAP antibody (from T. Kitamura, Institute of Medical Research Science, Tokyo, Japan)
- Mouse anti−P-myosin regulatory light chain antibody (Cell Signaling, 3675)
- Mouse anti-polo-like-kinase 1 antibody (Merck-Millipore, 05,844)
- Mouse anti-RhoA antibody (Santa Cruz, SC418)
- Goat anti−mouse IgG (H + L) secondary antibody, Alexa Fluor 594 conjugate
- Goat anti−rabbit IgG (H + L) secondary antibody, Alexa Fluor 488 conjugate
- Hoechst 33258
- Fluorescent mounting medium

- *Methods*

Labeling	Fixation Solution	Timing for Fixation	Primary Antibody Dilution	Secondary Antibody Dilution
AIM-1	Methanol	5 min/ −20°C	1/100	Mouse Alexa Fluor 594 1/500
MgcRacGAP	Methanol	5 min/ −20°C	1/100	Rabbit Alexa Fluor 594 1/500
P-myosin regulatory light chain	PFA 4%	15 min/4°C	1/50	Mouse Alexa Fluor 594 1/500
Polo-like-kinase 1	Methanol	5 min/ −20°C	1/200	Mouse Alexa Fluor 594 1/500
RhoA	Trichloroacetic acid 10%	15 min/4°C	1/100	Mouse Alexa Fluor 488 1/500

For the immunostaining of these different proteins, proceed as described in Section 1.2.6.1. Double immunostaining with β-tubulin antibody can also be performed to better characterize the behavior of these proteins.

- *Data Analysis*

Single-plane fluorescent images are taken as described in Section 1.1.4. For RhoA staining, *z*-axis stacks were collected using a piezoelectric device mounted at the base of a 63× magnification, on a Olympus BX63F microscope and an ORCA-Flash4.0 LT C11440-42U Hamamatsu camera controlled by Metamorph software (Molecular Device). A total of 20 planes (0.2 μm-thick slices) are captured for each cell and compiled as single two-dimensional projections using ImageJ software.

Fig. 7 illustrates that microtubule-dependent molecular signal such as MgcRacGAP is not correctly delivered to the equatorial cortex; consequently, RhoA is not

correctly anchored at the equatorial cortex, as normally observed during complete cytokinesis process.

1.2.6.3 Time-lapse videomicroscopy (Fig. 8)

Live-cell video microscopy of cultured primary hepatocytes represents another powerful tool to investigate cell behavior during cell cycle progression and in particular during mitosis/cytokinesis process. It has to be noticed that during primary culture of hepatocytes in our conditions, hepatocytes divided just once and a maximum mitotic index of 10% is reached at 60 h of culture (Guidotti et al., 2003).

- *Material*
  - 3.5-cm dishes (Falcon)
  - Coating solution
  - 1X PBS
- *Methods*

1. Glass coverslips with stimulated primary hepatocytes are mounted on the microscope after 48 h of culture after mitogenic treatment.

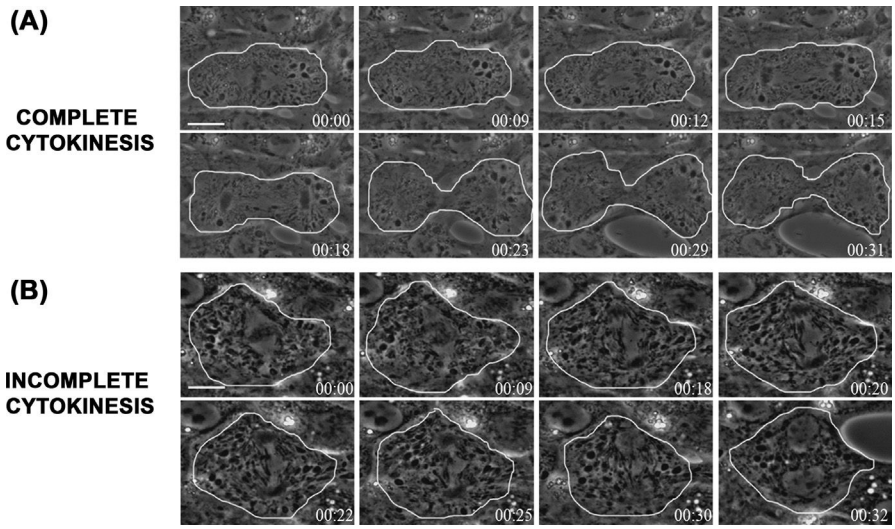


FIGURE 8 Monitoring cytokinesis process by time-lapse videomicroscopy.

Primary hepatocytes are isolated from the liver before (15-day-old rat) (A) and after weaning (25-day-old rat) (B) and cultured for 48 h in mitogenic (EGF/pyruvate) conditions. (A) During complete cytokinesis process, hepatocytes progress normally through anaphase: cells elongated preceding furrow formation and ingression. (B) During incomplete cytokinesis process, neither dynamic shape changes (cell elongation) nor furrow ingression is observed. Images are shown at selected time points (minutes). The outlines show cell shape.

Adapted from Margall-Ducos, G., Morizur-Celton, S., Couton, D., Bregerie, O., & Desdouets, C. (2007). Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. Journal of Cell Science, 120*(20), 3633–3639.*

2. Before imaging, culture medium is replaced by a fresh mitogenic medium to remove dead cells which can perturb videomicroscopy.
3. During imaging, hepatocytes were on a stage heated at 37°C under a 5% CO_2 atmosphere.
4. Cells are filmed every 90 s with a Leica DMIRBE using a 63× lens (numerical aperture, 1.4), a condenser (working distance, 23 mm; numerical aperture, 0.53), and a Pentamax cooled CCD camera (Popper Scientific) coupled to an electronic shutter.
5. Metamorph 7.1 is used for computer-based image acquisition and analysis of live-cell data.

- *Data analysis*

Time-lapse observations in Fig. 8 illustrates the differences observed between primary hepatocytes before (complete cytokinesis/Fig. 8A; Movie 1) and after weaning (incomplete cytokinesis/Fig. 8B; Movie 2).

CONCLUSION

The liver is a quite fascinating organ. In addition to its crucial role in a wide array of metabolic processes, it also harbors regenerative capabilities that favor its response to several types of damage [partial hepatectomy (Gerlyng et al., 1993; Sigal et al., 1999), metabolic overload (Madra, Styles, & Smith, 1995; Yamada et al., 1998), chemical overload (Martin, McGregor, Sansom, Gould, & Harrison, 2001; Melchiorri et al., 1993), oxidative damage (Gorla, Malhi, & Gupta, 2001; Nakatani, Inouye, & Mirochnitchenko, 1997), and viral infection (Toyoda et al., 2005; Toyoda, Kumada, Bregerie, Brechot, & Desdouets, 2006)]. In these circumstances, the liver polyploidy profile can also be modified. However, the cellular and molecular mechanisms regulating polyploidy in these different situations are not fully understood. The combination of in situ and dynamic ex vivo approaches could then provide great tools to better decipher hepatocyte polyploidization and cell cycle regulation during liver physiopathological process.

ACKNOWLEDGMENTS

The studies were supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2010 BLANC 1123 02), the Fondation ARC pour la recherche contre le cancer (Fondation ARC no. SFI20111203568), the INCa-CHC (2009-1-CHC-03-INSERM), the Ligue Comité de Paris (RS06/75-57), and the CORDDIM Région Ile de France.

SUPPLEMENDARY DATA

Supplementary data related to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.04.006.

REFERENCES

Bement, W. M., Benink, H. A., & von Dassow, G. (2005). A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification. *Journal of Cell Biology, 170*(1), 91–101.

Burgess, D. R., & Chang, F. (2005). Site selection for the cleavage furrow at cytokinesis. *Trends in Cell Biology, 15*(3), 156–162.

Celton-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D., Margall-Ducos, G., & Desdouets, C. (2009). The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. *The Journal of Clinical Investigation, 119*(7), 1880–1887.

D'Avino, P. P., Giansanti, M. G., & Petronczki, M. (2015). Cytokinesis in animal cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 7*(4), a015834.

D'Avino, P. P., Savoian, M. S., & Glover, D. M. (2005). Cleavage furrow formation and ingression during animal cytokinesis: a microtubule legacy. *Journal of Cell Science, 118*(Pt 8), 1549–1558.

Duncan, A. W., Hanlon Newell, A. E., Smith, L., Wilson, E. M., Olson, S. B., Thayer, M. J., … Grompe, M. (2012). Frequent aneuploidy among normal human hepatocytes. *Gastroenterology, 142*(1), 25–28.

Duncan, A. W., Taylor, M. H., Hickey, R. D., Hanlon Newell, A. E., Lenzi, M. L., Olson, S. B., … Grompe, M. (2010). The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature, 467*(7316), 707–710.

Eggert, U. S., Mitchison, T. J., & Field, C. M. (2006). Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annual Review of Biochemistry, 75*, 543–566.

Ganem, N. J., Storchova, Z., & Pellman, D. (2007). Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development, 17*(2), 157–162.

Gentric, G., & Desdouets, C. (2014). Polyploidization in liver tissue. *The American Journal of Pathology, 184*(2), 322–331.

Gentric, G., & Desdouets, C. (2015). Liver polyploidy: Dr Jekyll or Mr Hide? *Oncotarget, 6*(11), 8430–8431.

Gerlyng, P., Abyholm, A., Grotmol, T., Erikstein, B., Huitfeldt, H. S., Stokke, T., & Seglen, P. O. (1993). Binucleation and polyploidization patterns in developmental and regenerative rat liver growth. *Cell Proliferation, 26*(6), 557–565.

Gorla, G. R., Malhi, H., & Gupta, S. (2001). Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. *Journal of Cell Science, 114*(Pt 16), 2943–2951.

Guidotti, J. E., Bregerie, O., Robert, A., Debey, P., Brechot, C., & Desdouets, C. (2003). Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry, 278*(21), 19095–19101.

Hixon, M. L., Obejero-Paz, C., Muro-Cacho, C., Wagner, M. W., Millie, E., Nagy, J., … Gualberto, A. (2000). Cks1 mediates vascular smooth muscle cell polyploidization. *The Journal of Biological Chemistry, 275*(51), 40434–40442.

Jordan, S. N., & Canman, J. C. (2012). Rho GTPases in animal cell cytokinesis: an occupation by the one percent. *Cytoskeleton (Hoboken), 69*(11), 919–930.

Kamijo, K., Ohara, N., Abe, M., Uchimura, T., Hosoya, H., Lee, J. S., & Miki, T. (2006). Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation. *Molecular Biology of the Cell, 17*(1), 43–55.

Kudryavtsev, B. N., Kudryavtseva, M. V., Sakuta, G. A., & Stein, G. I. (1993). Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology, 64*(6), 387–393.

Loyer, P., Cariou, S., Glaise, D., Bilodeau, M., Baffet, G., & Guguen-Guillouzo, C. (1996). Growth factor dependence of progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes in vitro. Evidence of a mitogen restriction point in mid-late G1. *The Journal of Biological Chemistry, 271*(19), 11484–11492.

Madra, S., Styles, J., & Smith, A. G. (1995). Perturbation of hepatocyte nuclear populations induced by iron and polychlorinated biphenyls in C57BL/10ScSn mice during carcinogenesis. *Carcinogenesis, 16*(4), 719–727.

Margall-Ducos, G., Morizur-Celton, S., Couton, D., Bregerie, O., & Desdouets, C. (2007). Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. *Journal of Cell Science, 120*(20), 3633–3639.

Martin, N. C., McGregor, A. H., Sansom, N., Gould, S., & Harrison, D. J. (2001). Phenobarbitone-induced ploidy changes in liver occur independently of p53. *Toxicology Letters, 119*(2), 109–115.

Melchiorri, C., Chieco, P., Zedda, A. I., Coni, P., Ledda-Columbano, G. M., & Columbano, A. (1993). Ploidy and nuclearity of rat hepatocytes after compensatory regeneration or mitogen-induced liver growth. *Carcinogenesis, 14*(9), 1825–1830.

Mierzwa, B., & Gerlich, D. W. (2014). Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control. *Developmental Cell, 31*(5), 525–538.

Nakatani, T., Inouye, M., & Mirochnitchenko, O. (1997). Overexpression of antioxidant enzymes in transgenic mice decreases cellular ploidy during liver regeneration. *Experimental Cell Research, 236*(1), 137–146.

Otto, S. P., & Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics, 34*, 401–437.

Pandit, S. K., Westendorp, B., & de Bruin, A. (2013). Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends in Cell Biology, 23*(11), 556–566.

Sigal, S. H., Rajvanshi, P., Gorla, G. R., Sokhi, R. P., Saxena, R., Gebhard, D. R., Jr., … Gupta, S. (1999). Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *American Journal of Physiology, 276*(5 Pt 1), G1260–G1272.

Storchova, Z., & Pellman, D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 5*(1), 45–54.

Strickland, L. I., Wen, Y., Gundersen, G. G., & Burgess, D. R. (2005). Interaction between EB1 and p150glued is required for anaphase astral microtubule elongation and stimulation of cytokinesis. *Current Biology, 15*(24), 2249–2255.

Toyoda, H., Bregerie, O., Vallet, A., Nalpas, B., Pivert, G., Brechot, C., & Desdouets, C. (2005). Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis. *Gut, 54*(2), 297–302.

Toyoda, H., Kumada, T., Bregerie, O., Brechot, C., & Desdouets, C. (2006). Conserved balance of hepatocyte nuclear DNA content in mononuclear and binuclear hepatocyte populations during the course of chronic viral hepatitis. *World Journal of Gastroenterology, 12*(28), 4546–4548.

Van der Heijden, F. L., & James, J. (1975). Polyploidy in the human myometrium. *Zeitschrift für Mikroskopisch-Anatomische Forschung, 89*(1), 18–26.

Yamada, T., Sogawa, K., Kim, J. K., Izumi, K., Suzuki, Y., Muramatsu, Y., … Matsumoto, K. (1998). Increased polyploidy, delayed mitosis and reduced protein phosphatase-1 activity associated with excess copper in the Long Evans Cinnamon rat. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 99*(3), 283–304.

Yuce, O., Piekny, A., & Glotzer, M. (2005). An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *The Journal of Cell Biology, 170*(4), 571–582.

RESUME

Rôle de la MAP Kinase p38 alpha au cours d'une agression aiguë du foie

Afin de lutter contre des agressions aiguës induites par une hépatite virale, des toxines ou bien une surcharge médicamenteuse, le foie active différents processus interconnectés tels que la prolifération hépatocytaire, l'inflammation ou la mort cellulaire. Une protéine clé se trouve au carrefour de ces différents processus cellulaires : la MAP (Mitogen Activated Protein) Kinase p38 alpha. Dans le foie, de nombreux travaux décrivent un double rôle de cette protéine. En effet, elle est considérée comme un suppresseur de tumeur en régulant négativement la prolifération des hépatocytes, cellules majoritaires du foie, mais peut aussi agir comme un oncogène en favorisant certains processus liés au cancer et notamment l'inflammation. Cependant, son action lors d'une agression aiguë du foie adulte reste peu caractérisée.

L'objectif de mon travail de thèse était donc de caractériser le rôle de la protéine p38α lors d'une agression hépatique aiguë, grâce à un modèle murin pour lequel l'expression de cette protéine est invalidée spécifiquement dans les hépatocytes matures (modèle murin p38$\alpha^{\Delta H}$). Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le modèle expérimental d'hépatopathie classiquement utilisé pour reproduire la division hépatocytaire en contexte inflammatoire : le modèle du tétrachlorure de carbone (CCl_4). L'injection de cet hépatotoxique à des souris entraine une cytolyse hépatocytaire dans les zones centro-lobulaires rapidement suivie par une infiltration de cellules immunitaires et une prolifération compensatoire des hépatocytes sains, pour réparer le tissu lésé. Des souris contrôles (CTR) et p38$\alpha^{\Delta H}$ ont été sacrifiées à différents temps après injection permettant d'établir une cinétique post- CCl_4, au cours de laquelle du sang et du tissu hépatique ont été collectés. Les lésions hépatiques, l'inflammation, l'apoptose et la prolifération ont ensuite été étudiées.

Tout d'abord, nous montrons que la perte d'expression de la protéine p38α confère un effet protecteur contre les lésions hépatiques induites par le CCl_4. En effet, les zones de cytolyse et les taux d'alanine transaminase (reflet des dommages hépatiques) sont significativement diminués (de 40H à 60H post-CCl_4) chez les souris p38$\alpha^{\Delta H}$. Ce résultat a également été obtenu en réponse à une overdose de paracétamol (APAP). Par ailleurs, ce phénotype ne semble pas être attribué à un défaut d'apoptose, ni à une métabolisation différente du CCl_4 entre nos deux groupes de souris. De plus, l'augmentation de l'expression du *Collagène 1α* à 40H post-CCl_4 suggère une réparation tissulaire précoce chez les souris p38$\alpha^{\Delta H}$. p38α est classiquement décrite dans la littérature comme un régulateur négatif de la prolifération. De manière surprenante, la réponse proliférative hépatocytaire n'est pas modifiée en absence de p38α (marquage BrdU, taux des Cyclines D1, A2 et B1). L'hépatoprotection observée lors de la cinétique de régénération semble donc être indépendante du rôle de p38α en tant que point de contrôle du cycle cellulaire. D'autre part, nous montrons que la réponse antioxydante dans le foie des souris p38$\alpha^{\Delta H}$ est amplifiée et pourrait donc participer à la protection du tissu hépatique. Enfin, nos travaux montrent un recrutement massif de cellules inflammatoires dans les zones de cytolyse corrélé à une augmentation importante des niveaux de cytokines (*Tnfα* et *Tgfβ*). L'hépatoprotection médiée par la perte de p38α est dépendante de signaux chimiotactiques (*Ccl2* et *Ccl5*), dont l'inhibition exacerbe les lésions hépatiques induites par le CCl_4. L'ensemble de ces données suggèrent fortement que la déficience en p38α entraine une réponse immunitaire spécifique favorisant le nettoyage et la réparation du tissu hépatique.

En conclusion, mes travaux de thèse montrent que lors d'une lésion aiguë du tissu hépatique l'absence de la MAP Kinase p38α protège le foie en induisant une réponse immunitaire spécifique favorisant une réparation précoce du tissu et le maintien de l'homéostasie hépatique.

Mots clés : MAPK p38 alpha, foie, pathologie hépatique aiguë, lyse-régénération, microenvironnement immunitaire