

Université de Sherbrooke

L'expression du 'suppressor of cytokine signaling 1 '(SOCS1) dans les hépatocytes et les macrophages est essentielle pour contrôler la réponse fibro-hépatique

Par
Kawila Mafanda Euphrasie
Programme d'immunologie

Mémoire présenté(e) à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
En vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
En immunologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Mai, 2018

Membres du jury d'évaluation
Pr Subburaj Ilangumaran, PhD, pédiatrie-immunologie
Pr Claire Dubois, PhD, pédiatrie-immunologie
Pr Benoit Paquette, médecine nucléaire et radiobiologie

© Kawila Mafanda Euphrasie, 2018

Dédicace

Je dédie ce travail :

A mon époux Sylvestre Ntambuka;

A mes enfants : Sylvie Bechire, David N'sibula, Merveil Nyamukeya, Daniel Mafanda, Pascal Yalumire, Naomie Namwezi et Ben Zabika.

A ma très chère mère Thérèse Mujinga

A mes Frères et sœur : Musumba chakamisa, Kabwe kibelushi et Nanette Kamasongo.

Épigraphe

« Heureux l'homme qui a trouvé la connaissance et celui qui possède l'intelligence, car le gain qu'elles procurent est préférable à celui de l'argent, et le profit qu'on en tire vaut mieux que l'or » Proverbe de Salomon

RÉSUMÉ

L'expression du 'suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) dans les hépatocytes et les macrophages est essentielle pour contrôler la réponse fibro-hépatique

Par
Kawila Mafanda Euphrasie
Programmes d'Immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Immunologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Une lésion persistante du foie peut provoquer une fibrose hépatique (FH), une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire. La compréhension de la pathogenèse moléculaire de la FH pourrait conduire à des nouveaux traitements pour ces maladies. Le suppresseur de la signalisation de cytokine 1 (SOCS1) régule plusieurs cytokines et facteurs de croissance impliqués dans la pathogénèse de la FH. Ici, nous avons étudié la fonction anti-fibrogénique de SOCS1 dans les hépatocytes et les macrophages.

Des souris dépourvues de SOCS1 dans les hépatocytes (*Socs1^{fl/fl} Alb^{Cre}*; *Socs1 Δ Hep*) ou des macrophages (*Socs1^{fl/fl} LysM^{Cre}*; *Socs1 Δ M ϕ*) ont été générées et nous avons évalué la réponse fibro-hépatique au tétrachlorure de carbone (CCl₄). Les lésions hépatiques et la fibrose ont été évaluées par les taux d'Alanine Aminotransférase (ALT), l'histopathologie et le taux d'hydroxyproline dans le foie. Les changements dans l'expression des enzymes de la matrice extracellulaire et du remodelage, des cytokines et des chimiokines ont été évalués par qRT-PCR.

Les souris *Socs1^{fl/fl} Alb^{Cre}* et *Socs1^{fl/fl} LysM^{Cre}* ont présenté une FH sévère caractérisée par une augmentation en dépôt de collagène, de la teneur en hydroxyproline, de l'accumulation de myofibroblastes et de l'expression des gènes *Acta2* et *Co1a1*. Le traitement par CCl4 a causé des dommages significatifs aux hépatocytes chez les souris *Socs1^{fl/fl} Alb^{Cre}* mais pas chez les souris *Socs1^{fl/fl} LysM^{Cre}*. Les deux souris ont montré une expression réduite de *Mmp2* et une augmentation de l'expression de *Timp1*. L'induction de *Il6*, *Tnfa* et *Tgfb* n'était pas significativement altérée par une déficience en SOCS1 dans les hépatocytes ou dans les macrophages, ce qui diminuait l'INF γ et augmentait l'expression de *Pdgfb*. Les foies *Socs1^{fl/fl} Alb^{Cre}* et *Socs1^{fl/fl} LysM^{Cre}* présentaient une augmentation de l'infiltration des cellules mononucléaires associée à une expression élevée de *Ccl2*, tandis que les foies *Socs1^{fl/fl} LysM^{Cre}* présentaient également une expression accrue de *Cx3cr1*.

SOCS1 est donc un régulateur clé de la FH. Il exerce ses fonctions anti-fibrotiques dans les hépatocytes et les macrophages. Alors que le SOCS1 dans les hépatocytes atténue la mort cellulaire, dans les cellules myéloïdes il contrôle la cascade inflammatoire conduisant à la FH.

Mots clés : Fibrose hépatique, cytokines, SOCS1, hépatocyte, macrophage

Summary

Suppressor of Cytokine Signaling 1 expression in hepatocytes and macrophages is critical to control hepatic fibrogenic response

By
Kawila Mafanda Euphrasie
Immunology program

Thesis presented at the Faculty of medicine and health sciences for the obtention of Master of sciences (M.Sc.) in Immunology, Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Background & Aim: Persistent liver injury causes liver fibrosis (LF), cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Understanding of the molecular pathogenesis of LF could lead to new treatments for these diseases. Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1), which regulates several cytokines and growth factors implicated in LF, attenuates LF. Here, we investigated the anti-fibrogenic function of SOCS1 in hepatocytes and macrophages.

Methods: We have generated mice lacking SOCS1 in hepatocytes (*Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}*) or macrophages (*Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}*) and evaluated hepatic fibrogenic response to carbon tetrachloride (CCl₄). Liver damage and fibrosis were evaluated by serum Alanine Amino Transferase (ALT) levels, histopathology and hydroxyproline content. Changes in the expression of extracellular matrix and remodeling enzymes, cytokines and chemokines were assessed by qRT-PCR.

Results: *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* and *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice showed severe LF characterized by increased collagen deposition, hydroxyproline content, myofibroblast accumulation and expression of *Acta2* and *Co1a1* genes. CCl₄ treatment caused significant damage to hepatocytes in *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* mice but not in *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice. Both mice showed

reduced expression of *Mmp2* and increased expression of *Timp1*, *Il6*, *Tnfa* and *Tgfb* induction were not significantly altered by SOCS1 deficiency in hepatocytes or macrophages, which diminished $\text{INF}\gamma$ and augmented *Pdgfb* expression. Both *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* and *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* livers showed increased mononuclear cell infiltration accompanied by elevated *Ccl2* expression, whereas *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* livers also showed increased *Cx3cr1* expression.

Conclusions: SOCS1 is an important regulator of LF and exerts its anti-fibrotic functions in both hepatocytes and macrophages. Whereas SOCS1 in hepatocytes attenuate cell death, SOCS1 in myeloid cells control the inflammatory cascade leading to LF.

Keywords: Liver fibrosis, cytokines, SOCS1, hepatocyte and macrophage

TABLE DES MATIERES

Résumé	iv
Summary	iv
Table des matières	viii
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xii
Liste des abréviations	xiii
Introduction	1
1.1 Foie	1
1.1.1 Généralités	1
1.1.2 Principales causes des blessures du foie	2
1.1.3 Fonctions du foie	3
1.1.4 La circulation sanguine et le foie	4
1.1.5 Les différentes cellules du foie et leurs fonctions	4
1.2. Les CSH dans la physiologie du foie	6
1.2.1 Métabolisme des rétinoïdes	7
1.2.2. La matrice extracellulaire dans un foie normal	7
1.2.3. Les MMPs	8
1.2.3.1. Nomenclature, structure et classification des MMPs	9
1.2.4 Les inhibiteurs tissulaires endogènes	9
1.3 LA FIBROSE HEPATIQUE	10
1.3.1 Généralités	11
1.3.2 Épidémiologie	11
1.3.3 Les causes de la fibrose hépatique	11
1.3.4 La progression de la fibrose hépatique	12
1.3.5 Les caractéristiques clés de la fibrose hépatique	13
1.3.6 Le mécanisme de la fibrose hépatique	13

1.3.6.1	Rôle des CSH dans le développement de la fibrose	14
1.3.6.2	Les facteurs de croissance.....	14
1.3.6.3	L'activation des cellules stellaires hépatiques.....	15
1.4	Les stades de la fibrose hépatique.....	22
1.5	Le traitement de la fibrose hépatique.....	23
1.6	Réversibilité de la fibrose hépatique.....	24
1.7	Rôles des macrophages dans la fibrose.....	26
1.7.1	Phase de progression de la fibrose hépatique et implication des macrophages.....	28
1.7.2	Phase de régression de la fibrose hépatique.....	29
1.7.3	La polarisation des macrophages.....	30
1.8	La famille des protéines SOCS	30
1.8.1	La structure de la famille des protéines SOCS	31
1.8.2	Rôle des domaines des protéines SOCS.....	32
1.8.3	Mécanismes d'action des protéines SOCS.....	33
1.9	SOCS1.....	34
1.9.1	Le SOCS1 et la répression de tumeur.....	36
1.9.2	SOCS1 et le système immunitaire.....	37
1.9.3	Rôle SOCS1 dans la fibrose hépatique.....	37
2.	Hypothèse/problématique.....	39
Objectifs.....		39
3.	Article 1.....	40
4.	Discussion.....	70
5.	Conclusions.....	75
6.	Remerciements.....	76
6.	Liste des références.....	77

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Présentation du lobule hépatique	Error! Bookmark not defined.
Figure 2 : Présentation de la structure du foie normal et foie blessé.....	4
Figure 3 : Progression des maladies du foie.....	11
Figure 4 : L'activation des cellules stellaires hépatiques.....	18
Figure 5 : Mécanismes inhibiteurs des protéines SOCS.....	34

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Nomenclature des MMPs et leurs substrats spécifiques	9
Tableau 2 Evaluation des stades histologiques de fibrose	22

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ALT	Alanine Aminotransférase
CCl ₄	Tétrachlorure de carbone
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CIS	Contenant SH2 inductible par les cytokines protéine
CSH	Cellules stellaires hépatiques
DC	Cellules dendritiques
DEN	Le N-Diéthylnitrosamine
DMN	le N Diméthylnitrosamine
ET-1	L'endothéline-1
GdCl ₃	Gadolinium chloride
HGF	Hepatocyte growth factor
HVB	L'hépatite virale B
HVC	L'hépatite virale C
IP	Injection intrapéritonéale
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire-1
JAB	Protéine JAK-binding
JAK1	Janus kinase 1
KIR	Inhibitrice de la kinase
MCP-1	Protéine chimiotactique des monocytes
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéinases
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NO	Monoxyde d'azote
PDGF	Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PIAS	Protéines inhibitrices de l'activation des STATS
SMA	Actine α-musculaire lisse

SNC	Système nerveux central
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling
SSI	Inhibiteur STAT induit par STAT
TAA	Thiocétamide
TH	Transplantation hépatique
TIMP	Tissus inhibiteurs endogènes
TGF- β	Transforming growth factor
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

1. INTRODUCTION

1.1 Le foie

1.1.1 Généralités

Le foie est le plus grand organe du corps. Il est doté de fonctions métaboliques plus importantes qui impliquent la digestion des aliments, la clairance des substances toxiques, la synthèse des protéines plasmatiques et le stockage des certaines vitamines liposolubles A, E, D et K. (Miyajima et al., 2014).

Du point de vue de l'anatomie macroscopique du corps, le foie est situé dans la cavité abdominale sous le diaphragme du côté droit. Il est le plus gros organe pesant environ 1,5kg. Chez l'humain, il est composé de 4 lobes dont deux principaux qui sont le lobe droit (plus grand) et le lobe gauche séparés par le ligament falciforme. Entre les deux principaux lobes, il y a deux petits lobes qui sont le lobe caudé et le lobe carré. Les lobes à leur tour sont subdivisés en segments. Le foie est entouré d'une membrane en tissu conjonctif fibreux qui est appelé capsule de Glisson (Walker, 1966; Roan, 2010).

Du point de vue de l'anatomie microscopique du corps, le foie est composé des unités fonctionnelles et structurales appelées lobules hépatiques. Ces derniers sont constitués des hépatocytes, des vaisseaux hépatiques et des canaux biliaires. Les millions de lobules sont séparés les uns des autres par les vaisseaux sanguins qui les alimentent et qui collectent les substances produites par les lobules. Ils sont également traversés par les canaux biliaires qui servent à collecter la bile produite par les hépatocytes. Au centre de chaque lobule hépatique, il y a une veine centrale qui est chargée de collecter le sang qui quitte le foie. Les hépatocytes représentent environ 80% des cellules du foie, les macrophages résidents (cellules de Kupffer) sont estimés à environ 5-6%, les cellules endothéliales sinusoidales entre 6-8% et les cellules stellaires hépatiques (CSH) 2-3% (Yang et al., 2006).

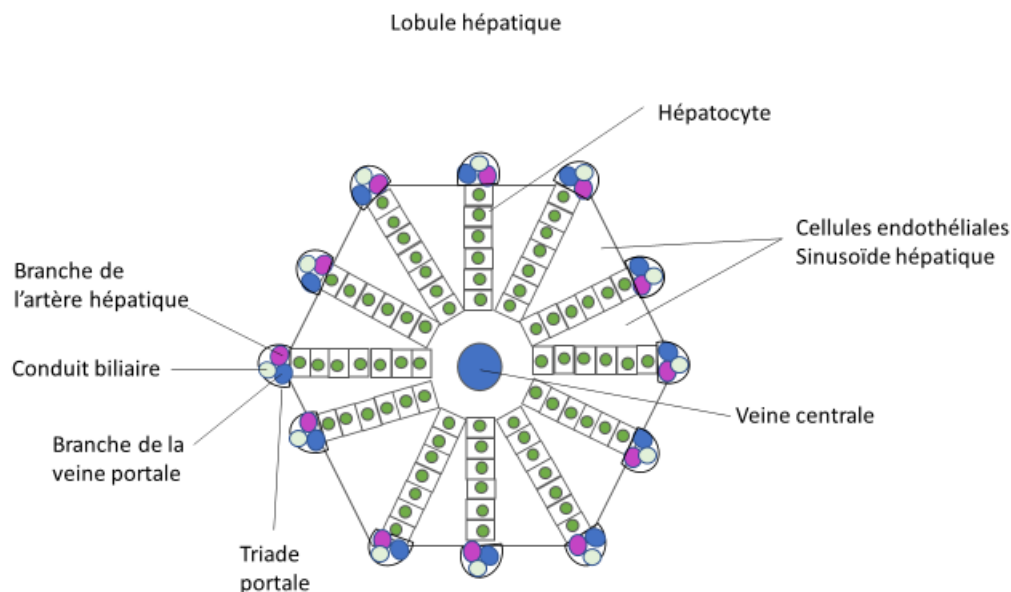


Figure 1 : Présentation du lobule hépatique.

Le lobule est composé des travées d'hépatocytes entre lesquelles se trouvent les cellule endothéliales sinusoides. Ils se rejoignent au niveau de la veine centrale. En périphérie du lobule se trouvent les canalicules biliaires. La triade portale qui est constitué de l'ensemble du canal biliaire, de la veine porte et de l'artère hépatique.

Il est à noter que le foie fait l'exception en tant qu'organe d'avoir la capacité de se régénérer lorsqu'il subit des blessures de n'importe quelle origine (Fausto et al., 2006).

1.1.2. Principales causes des blessures du foie

Dans les pays industrialisés, les causes les plus courantes des blessures au foie sont les suivantes : l'abus d'alcool, l'hépatite B et C, les syndromes métaboliques dus à l'obésité, et l'hépatite auto-immune.

L'hépatite due à l'alcool se développe que chez une portion de grands consommateurs évaluée entre 30 à 35% des cas qui arrivent à développer une forme avancée comme une fibrose au stade avancé ou jusqu'à une cirrhose. La prévalence de la fibrose dans la maladie alcoolique est évaluée entre 7 et 8% (Gao, Bin et Bataller ,2011).

L'hépatite virale B(HVB) étant la seconde cause de cirrhose et du cancer de foie. Tandis que L'hépatite virale C (HVC) est un facteur de risque important pour l'hépatocarcinome, qui

survient après une dizaine d'années qui suivent l'infection. Les stéatopathies métaboliques sont caractérisées par une surcharge graisseuse au niveau du foie dont le spectre va de la stéatose à la stéatohépatite pour conduire à une cirrhose voire au développement d'un carcinome hépatocellulaire.

1.1.3 Fonctions du foie

Le foie assure plusieurs fonctions vitales qui sont très variables et dont les principales sont :

- ❖ *L'élimination des potentielles toxines* : provenant des produits alimentaires et des certains médicaments. Les cellules hépatiques hébergent une panoplie d'enzymes qui sont impliquées dans la biotransformation des substances ayant des propriétés toxiques. La transformation vise leur désactivation et leur élimination.
- ❖ *La production de la bile* : La bile est produite et secrétée en continue par les hépatocytes. Elle est par la suite stockée dans la vésicule biliaire qui la libère dans l'intestin après un repas.
- ❖ *Le métabolisme des glucides* : Dans son rôle de moduler la glycémie, le foie stocke le glucose sous forme de glycogène enfin de le fournir à l'organisme en cas de besoin surtout au moment de la carence en apport exogène. Ceci permet de maintenir la glycémie à un taux normal.
- ❖ *Le métabolisme des lipides* : Le foie assure l'équilibre des lipides et du cholestérol. Comme les tissus adipeux, le foie produit les acides gras à partir de l'acétyl coenzyme A. Les acides gras produits peuvent alors constituer des réserves. En cas de besoin en énergie, le foie peut hydrolyser les triglycérides et produire l'acétyl Coenzyme A. Ce dernier est dégradé par le cycle de Krebs pour produire de l'énergie. En ce qui concerne le cholestérol, le foie a la capacité de le synthétiser et aussi de le dégrader.
- ❖ *Le métabolisme des protéines* : Le foie est à même de produire des nouvelles molécules de protéines par catabolisme des acides aminés ou encore de posséder à leur élimination sous forme d'urée.
- ❖ *Le stockage des certaines vitamines* : les vitamines liposolubles en l'occurrence la vitamine A, la vitamine D, la vitamine E et la vitamine K qui sont condensées ou accumulées dans l'organisme au niveau du foie et seront libérées au moment où

l'organisme en a besoin. Il est à signaler que le stock excessif est nuisible à la santé. (Block et al. , 2017)

1.1.4 La circulation sanguine et le foie

Le foie est l'organe le plus vascularisé de l'organisme humain. 1,4 litres de sang le traverse à la minute. Cette alimentation est assurée par deux sources distinctes :

- ❖ L'artère hépatique qui apporte le sang provenant du cœur, qui est riche en oxygène nécessaire pour multiples activités hépatiques;
- ❖ La veine porte qui amène le sang provenant des intestins et de la rate. Le sang provenant des intestins contient les métabolites de la digestion : acides aminés, monosaccharides, lipides simples, les vitamines ainsi que les acides biliaires. Tandis que celui provenant de la rate est riche en métabolites d'hémoglobine.

Le sang pénètre le foie par les sinusoides hépatiques qui se croisent au milieu d'un lobule hépatique et l'ensemble de lobules forment la veine centrolobulaire. Tandis que l'évacuation du sang est assumée par les veines sus-hépatiques.

1.1.5 Les différentes cellules du foie et leurs fonctions

Le parenchyme du foie normal contient un épithélium qui est constitué des cellules suivantes : hépatocytes, cholangiocytes, une paroi des cellules endothéliales caractérisée par des fenestrations ou des pores, les macrophages résidents nommés cellules de Kupffer et des cellules mésenchymateuses appelées cellules stellaires hépatiques (CSH) anciennement appelée cellules d'îlot ou lipocytes (Papoulas et Theocharis, 2009).

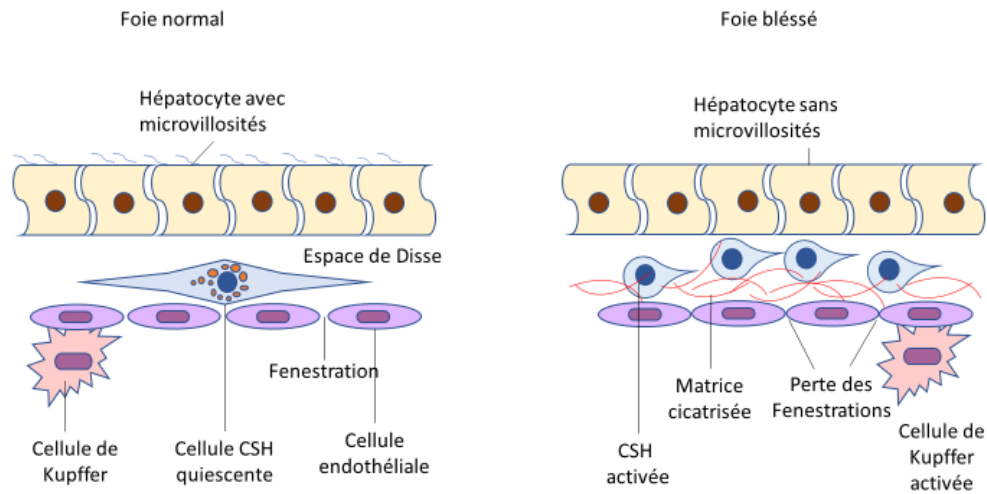


Figure 2 : Présentation de la structure du foie normal et foie blessé :

La blessure au foie entraîne plusieurs modifications notamment : l'activation des cellules étoilées conduisant à la perte des gouttelettes lipidiques qui servent au stockage de la vitamine A, la perte des microvillosités sur les hépatocytes et la perte des fenestrations entre les cellules endothéliales.

a. Les hépatocytes :

Les hépatocytes sont des cellules principales et majoritaires du foie. Ils représentent environ 80% des cellules et 94% de la masse du foie. Ils accomplissent un nombre important de fonctions métaboliques, endocriniennes et sécrétoires. En ce qui concerne la sécrétion, ils sécrètent la bile de façon continue. La bile sécrétée est indispensable à la digestion en général et principalement à celle des lipides. Du foie, la bile sécrétée est transportée dans le duodénum à travers les voies biliaires qui sont bordées des cholangiocytes. Les hépatocytes produisent aussi de façon successive certaines protéines du système du complément et parviennent à garder leurs concentrations sériques assez élevées, éliminant ainsi les agents pathogènes (Qin et Gao , 2006).

b. Les cholangiocytes:

Les cholangiocytes participent à la composition finale et au volume de la sécrétion biliaire par des événements basaux et hormonodépendants (Franchitto et al., 2013). Dans des conditions normales, l'une des plus importantes et fonctions des cholangiocytes et la mieux

étudiée est la libération de bicarbonate induite par la sécrétine dans la bile (Maroni et al., 2015; Roberts et al., 1997).

c. Les cellules stellaires hépatiques (CSH).

Elles représentent environ 15% du nombre total de cellules résidents du foie, elles constituent le principal site de stockage des rétinoïdes (la vitamine A et ses métabolites) qui sont des régulateurs transcriptionnels qui modulent puissamment l'expression de plus de 500 gènes. (Balmer et Blomhoff, 2002). L'altération de la signalisation des rétinoïdes a été démontrée comme étant associée au processus pathologiques de plusieurs maladies, y compris les maladies du foie (Shirakami et al., 2012). Plusieurs publications démontrent l'implication majeure de la signalisation des rétinoïdes dans le métabolisme des lipides hépatiques et dans la biologie des CSH (Bechmann et Canbay, 2014).

1.2. Les CSH dans la physiologie du foie

Les CSH, également appelées cellules de stockage de lipides ou cellules de Ito, sont localisées dans l'espace de Disse. Elles participent au développement du foie dans les conditions normales, au métabolisme des rétinoïdes et à l'homéostasie de la matrice extracellulaire, ainsi qu'à la sécrétion de nombreux médiateurs.

Elles sécrètent plusieurs médiateurs qui participent à l'organogénèse et à la régénération du foie (Asahina et al., 2002). Elles expriment également l'épimorphine, une protéine morphogénique mésenchymale qui est impliquée dans la différenciation des cellules souches hépatiques de rat (Miura et al., 2003). Les précurseurs des CSH qui sont isolés d'un foie fœtal ont une forte activité de prolifération et également une forte capacité de produire le facteur de croissance hépatocytaire (hepatocyte growth factor : HGF), la chimiokine CXCL12 et des facteurs de transcription homeobox, qui contribuent au développement hépatique et à l'hématopoïèse (Kubota et al., 2007).

1.2.1 Métabolisme des rétinoïdes

Les CSH contiennent la plus grande réserve de rétinoïdes évaluée à 60% par rapport aux réserves totales de l'organisme (Wake, 1971). Les rétinoïdes apportés par l'alimentation sont absorbés au niveau des intestins et sont acheminés aux hépatocytes sous forme d'esters de rétinol. Au niveau du foie, ils sont hydrolysés par la lipase hépatique en rétinol libre qui est transféré aux CSH où ils sont de nouveau ré-estérifiés (Hendriks et al., 1985). Le stockage des rétinoïdes s'effectue dans des gouttelettes qui contiennent aussi des triglycérides, des phospholipides, du cholestérol, et des acides gras (Moriwaki et al., 1988; Yamada et al., 1987).

1.2.2. La matrice extracellulaire dans un foie normal

A l'homéostasie, la MEC (matrice extracellulaire) constitue environ 0,5% de la masse totale du foie (Rojkind et al., 1979) partagée au niveau des espaces portes, des veines centrales et de la capsule de Glisson, et une faible proportion dans l'espace de Disse (Geerts et al., 1991). La MEC normale est composée des collagènes (I, III, IV, V, VI, XIV, et XVIII), de l'élastine, des glycoprotéines (laminine, fibronectine, 46 nidogène/entactine, ostéopontine, des protéines riches en cystéine), des protéoglycanes (héparane sulfate, chondroïtine 4-sulfate, chondroïtine 6-sulfate, dermatane sulfate, syndecane, biglycane, et décorine), et de l'acide hyaluronique (Frizell et al., 1995; Kawashima et al., 1999 et Schuppan, 1990). Bien que présente en quantité modeste dans l'espace de Disse, la MEC joue un rôle important dans la conservation de l'homéostasie du foie et possède un profil de localisation unique. Le collagène de type IV est généralement localisé entre les cellules endothéliales et les CSH, alors que les collagènes fibreux de type I et III sont localisés entre les CSH et les hépatocytes (Bissell et al., 1987; Friedman et al., 1989).

C'est pour cela que la composition de la MEC peut affecter le comportement des cellules qui se trouvent dans son environnement à partir de leurs récepteurs de surfaces, et plus particulièrement des intégrines. Ces dernières sont exprimées par les CSH sous forme $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$ (Racine-Samson et al., 1997), $\alpha v\beta 6$ (Popov et al., 2008), $\alpha 5\beta 1$ (Huang et Brigstock, 2011), et également la kinase liée aux intégrines (Shafiei et Rockey, 2012). Les trois types cellulaires présents autour de l'espace de Disse (hépatocytes, cellules endothéliales, CSH)

produisent du collagène de type I mais les hépatocytes sécrètent avant tout de la fibronectine (Ramadori et al., 1989). Les cellules endothéliales expriment le collagène de type IV, et les CSH quiescentes, la laminine et les collagènes de type III et IV (Geerts et al., 1989; Maher et McGuire, 1990). Le maintien de l'homéostasie de la MEC est assuré par l'équilibre entre la production de ses composants et leur dégradation. Les métalloprotéinases (MMPs) sont les principaux effecteurs de cette dégradation et leur activité est régulée par des tissus inhibiteurs endogènes (TIMPs). Plusieurs populations cellulaires du foie sont capables de produire à la fois des MMPs et des TIMPs (Arthur et al., 1989; Knittel et al., 1999).

1.2.3. Les MMPs

Ce sont des protéases ou des enzymes protéolytiques qui se distinguent par la présence d'un ion Zinc et qui se lient à trois résidus histidine sur leur site catalytique. Ces enzymes ont pour rôle la dégradation des constituants majeurs de la MEC qui sont les collagènes fibrillaires, les collagènes non fibrillaires et l'élastine à pH physiologique. En ce qui concerne leur nombre, il existe environ 28 MMPs chez l'homme et les plus importants sont cités ci-dessous (Tableau1) qui sont codées par différents gènes et produits par différentes cellules, notamment les cellules du tissu conjonctif et les cellules inflammatoires.(Chantrain et DeClerck, 2002) (Iredale, 1997)

Les MMPs peuvent également dégrader les protéoglycanes, glycosaminoglycanes ainsi qu'une variété d'autres protéines et glycoprotéines (Martin et Matrisian, 2004)(Tableau1). Ces enzymes jouent aussi un rôle important et complexe dans nombreuses étapes de la progression cancéreuse telles que la croissance de la tumeur, la prolifération cellulaires ou l'invasion cellulaire, la dissémination métastatique et l'angiogenèse. Ils sont donc des cibles potentielles dans le traitement du cancer. C'est pourquoi plusieurs inhibiteurs synthétiques ont été développés et ont montré une efficacité thérapeutique dans plusieurs modèles animaux de cancer. (Chantrain et DeClerck, 2002). La régulation des MMP est modulée par l'expression génique, la compartimentation et l'inhibition de leur activité est faites par les inhibiteurs tissulaires des MMPs (Timps). Notons aussi que de nombreux MMPs ne sont pas constitutivement transcrits, mais s'expriment après induction par des cytokines et des facteurs de croissance (Tallant et al., 2010).

1.2.3.1. Nomenclature, Structure et Classification des MMPs

La famille des MMPs est constituée de plus de 28 endopeptidases à l'heure actuelle, leur nomenclature est fonction de leurs protéines cibles (**Tableau1**). En ce qui concerne leur structure, ces protéines sont divisées en trois domaines : le domaine N-terminal, le domaine catalytique et le domaine C-terminal. Les MMPs partagent environ 40% de leurs structures primaires. Il y a environ 28 types des MMPs qui ont été découverts dont les plus importants sont cités ci-dessous (**Tableau1**). Les MMPs sont désignées par des numéros : MMP-1 à MMP-28 (Fridman , 2010).

Tableau 1 : Nomenclature des MMPs et leurs substrats spécifiques.

Noms des Enzymes	Noms des MMP	Substrats spécifiques
Collagénases	MMP-1 collagenase-1 (collagénase intestinale) MMP-8 (Collagénase neutrophile) MMP-13 (Collagenase-3)	Collagène fibrillaire: I, II, III, V, and XI.
Gélatinases	MMP-2 (Gélatinase-A) MMP-9 (Gélatinases-B)	Collagène du type IV, V, VII, X, XI, et XIV, Gélatine, Élastine.
Stromelysine	MMP-3 (Stromelysine 1) MMP-10 (Stromelysine 2)	Protéoglycane, Fibronectine, Laminine, Gélatine.
Matrilysine	MMP-7 (Matrilysine 1) MMP-26 (Matrilysine 2)	Fibronectine, Laminine, Nidogène, collagène du type IV, Protéoglycane, Betta 4 intégrine.
Type de membranes de MMPs	MT1-MMP ou MMP-14, MT2-MMP ou MMP-15, MT3-MMP ou MMP-16, MT4-MMP ou MMP-17, MT5-MMP ou MMP-24, MT6-MMP ou MMP-25	Gélatine, Fibronectine, Laminine-1, Vitronectine, Protéoglycane de cartilage et Fibrilline-1
Epilysine	MMP-28	Collagène IV

1.2.4 Les inhibiteurs tissulaires endogènes

Dès que les MMPs sont libérées dans l'espace extracellulaire ou activées, elles sont régulées par l' α 2-macroglobuline de façon non spécifique et spécifiquement par leurs inhibiteurs tissulaires endogènes qui sont les TIMPs, des protéines de 22- 29 kDa. Il est à noter qu'une activité non contrôlée des MMPs peut conduire à des graves lésions tissulaires (Stetler-Stevenson et Seo, 2005). Les TIMPs agissent en inhibant les MMPs et ils peuvent aussi réguler l'expression de leurs gènes. Ils possèdent un large spectre d'inhibition qui couvre la majorité des MMPs identifiées à ce jour.

Le génome humain comprend 4 gènes paralogues codant pour les TIMPs (TIMP-1 à -4). Les quatre TIMPs parviennent à inhiber tous les MMPs avec différentes affinités sauf le TIMP-3. (Brew et Nagase, 2010).

1.3 LA FIBROSE HEPATIQUE

1.3.1 Généralités

La fibrose est le résultat d'un processus de cicatrisation d'un tissu en réponse à des lésions qui répétitives. La fibrose peut se manifester dans plusieurs tissus ou organes notamment les poumons, la peau, le cœur, le rein, l'intestin et le foie. Ce processus de cicatrisation normal devient pathologique quand il devient chronique, ce qui produit une cicatrice excessive qui affecte la structure de l'organe avec des graves complications conduisant même à la défaillance de celui-ci. On retrouve des lésions chroniques dues au processus de cicatrisation au niveau du foie et les données actuelles montrent que leur prévalence va en augmentant, raison pour laquelle la fibrose hépatique s'impose aujourd'hui comme un enjeu de santé publique tant dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement. (S Friedman, 2003) (Yoshimura et al., 2007)

La fibrose hépatique découle des lésions chroniques du foie quelle qu'en soit la cause ou l'étiologie. Ces lésions sont accompagnées d'une accumulation de la matrice extracellulaire, qui est leur caractéristique principale commune. Le dépôt de la matrice extracellulaire engendre la modification de l'architecture du parenchyme hépatique conduisant ainsi à la

cicatrisation qui génère un tissu fibreux riche en collagène fibrillaire (Bataller et Brenner, 2005). Quand le foie devient fibrotique, il y a des changements qualitatifs et quantitatifs dans la composition de la MEC, notamment la teneur en collagène et en composantes non collagéniques augmentent de 3 à 5 fois. Cette augmentation entraîne le changement du type de MEC dans le sous-endothélial riche en collagène fibrillaire.

1.3.2 Épidémiologie

L'atteinte de fibrose hépatique est généralement silencieuse. Les signes qui l'accompagnent apparaissent au stade tardif qui correspond au stade cirrhotique (Navaneethan et al., 2009). Une fois la cirrhose installée, la résolution devient impossible tandis que l'évolution est rapide vers le cancer. Au stade de cirrhose, il existe environ 40% des cas qui demeurent asymptomatiques appelés cirrhoses décompensées dans lesquels la transplantation est le seul moyen thérapeutique à envisager (Andronikof, 2010). L'incidence annuelle de la cirrhose dans le monde varie de 1,3 à 5,9 %. L'incidence ainsi que la prévalence de la cirrhose et du cancer primitif du foie vont en augmentant. C'est pour cette raison que les recherches sont focalisées sur une meilleure prise en charge au stade fibrotique.

L'incidence de la fibrose hépatique au Canada, selon le rapport de la Fondation du foie publié en 2013, est à la hausse. Ce rapport révèle qu'un canadien sur 10 vit avec une certaine pathologie du foie et que c'est la stéatose qui est la maladie du foie la plus répandue avec 25% des cas. Par rapport au nombre annuel des décès, les décès dus à la cirrhose s'élèvent à 5000 décès par an. Et en ce qui concerne les prévisions d'ici 2030, les nouveaux cas de cancer augmenteront dans les deux sexes avec une augmentation du nombre annuel de nouveaux cas de 84% chez les hommes et de 74% chez les femmes.

1.3.3 Les causes de la fibrose hépatique

La fibrose a une multitude de causes dont les infections virales, les intoxications d'origines diverses, les troubles métaboliques, les réactions immunitaires et les anomalies congénitales (Friedman, 2000). Il existe une centaine de maladies qui peuvent affecter le foie. Les plus courantes sont: l'hépatite virale, la stéatose alcoolique, la stéatose non alcoolique, l'hépatite

alcoolique, les maladies auto-immunes. Il est à noter que les causes de certaines atteintes hépatiques sont inconnues (Pellicoro et al., 2014).

1.3.4 La progression de la fibrose hépatique

L'évolution naturelle de la fibrose hépatique est caractérisée habituellement par sa progression lente vers la cirrhose. Au fur et à mesure que la fibrose s'installe à cause d'une lésion hépatique chronique, le foie connaît des modifications à la fois dans les réponses cellulaires et dans la composition de la matrice extracellulaire. Il est à noter que les modifications de la MEC sont aussi bien qualitatives que quantitatives. La lésion s'installe pendant des mois ou des années avant que l'apparition d'une lésion importante, à l'exception de la maladie hépatique congénitale où l'évolution dans le temps peut être accélérée dépendamment du contexte pathologique. Au dernier stade appelé cirrhose, stade pendant lequel surviennent les modifications rendant la maladie symptomatique, il y a les complications majeures suivantes : insuffisance hépatocellulaire, hypertension portale ou carcinome hépatocellulaire (CHC) (Pierre et al., 2013) (Wade et al., 2013). La maladie reste asymptomatique au cours des stades qui précèdent la cirrhose. **(Figure 3)**

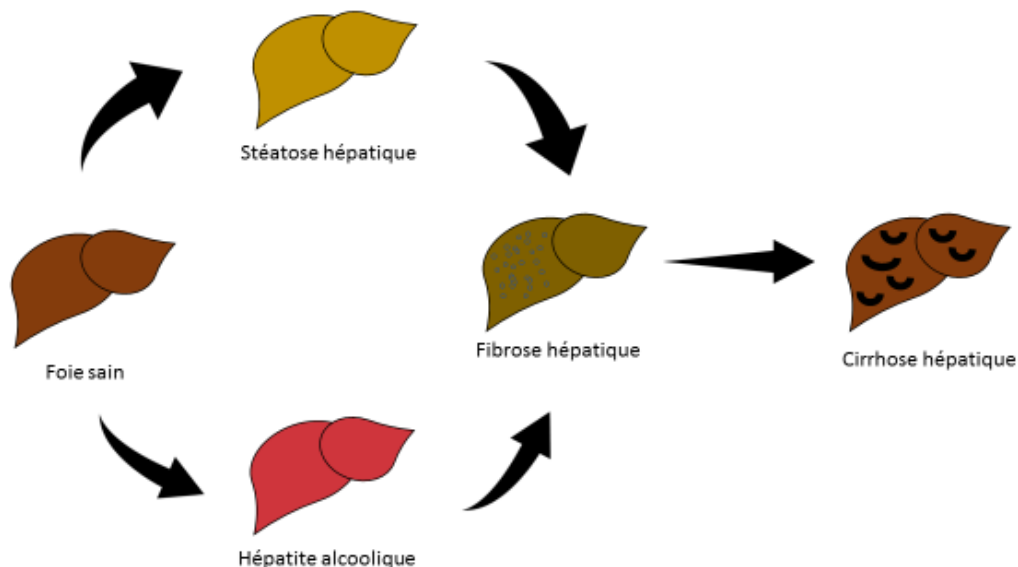


Figure 3: Progression des maladies du foie

Toutes les maladies du foie évoluent vers la fibrose hépatique qui peut évoluer vers la cirrhose qui évolue rapidement vers le cancer.

1.3.5 Les caractéristiques clés de la fibrose hépatique

La fibrose en tant que processus complexe fait intervenir en même temps les cellules parenchymateuses, non-parenchymateuses ainsi que les cellules immunitaires qui infiltrent le foie. Cette dynamique cellulaire est observée tant dans la phase de progression que dans la phase de résolution. La réponse du foie aux blessures est marquée par la production excessive des composants de la MEC ainsi que par la modification de leurs compositions principalement le remplacement du collagène de type IV et VI par le collagène de type I et III et des glycoprotéines et protéoglycanes par la fibronectine (Rojkind et Dunn, 1979).

Lorsque le foie subit une lésion, la situation peut se résoudre par la grande capacité du foie à se régénérer. Les cellules hépatiques lésées peuvent se régénérer et permettre ainsi au foie de reprendre ses fonctions. Cependant si la cause de l'atteinte hépatique est chronique, la situation évolue vers une cirrhose et finalement vers l'insuffisance hépatique ou le cancer (Bataller et Brenner, 2005).

1.3.6 Le mécanisme de la fibrose hépatique

La fibrose du foie survient dans un contexte d'une lésion chronique ou à la suite de dommages répétés qui conduit à une incapacité de régénération du tissu hépatique. C'est en ce moment que commence un processus de cicatrisation tissulaire qui fait intervenir de nombreux acteurs tant cellulaires que moléculaires. Cette fibrose se développe en deux étapes qui sont :

- La phase inflammatoire aiguë et
- La phase chronique.

Les deux étapes sont médiées par les macrophages et les fibroblastes hépatiques.

1.3.6.1 Rôle des CSH dans le développement de la fibrose

Lors de l'initiation de la fibrose, les cellules étoilées produisent des facteurs de croissance et prolifèrent. Elles vont également produire des cytokines pour évoluer vers la fibrogénèse et produire les TIMP1 et 2 pour modérer la dégradation de la MEC. Les CSH activées peuvent induire l'inflammation, et interagissent ainsi avec les cellules de l'inflammation qui à leur tour

influencent et contribuent à la fibrogénèse. Les macrophages sont les principales cellules inflammatoires induites lors de la fibrogénèse (Figure 3). Plusieurs études démontrant l'implication des CSH dans le développement et la croissance des tumeurs primaires et métastatiques ont conclu que les CSH contribuent à la fois à la réparation tissulaire et à la croissance tumorale (Dapito et al., 2012; Kang et al., 2011; Olasso et al., 2003)

1.3.6.2 Les facteurs de croissance

L'HGF est le principal mitogène des hépatocytes (Schirmacher et al., 1993). Les CSH quiescentes peuvent aussi le produire, mais il est remarquable de constater que lors de lésions hépatiques, son expression est réduite dans les CSH par l'action du TGF- β (Transforming growth factor) (Ramadori et al., 1992). Cette régulation pourrait donner une explication à la perte de la régénération du tissu hépatique dans un foie endommagé. Le TGF- β en tant que cytokine importante pour la régulation du phénotype des CSH (Bissell et al., 1995; Dooley et al., 2000) est sécrété sous forme latente, il est activé par les intégrines, le fibrinogène, et les activateurs de plasminogène de type urokinase pendant une atteinte hépatique qui amènent à l'activation des CSH (Botella et al., 2002; Racine-Samson et al., 1997; Stärkel et al., 2003). Le TGF- β a un rôle d'importance capitale dans le développement embryonnaire, le remodelage tissulaire, l'inflammation, l'angiogenèse, l'athérosclérose, la fibrose et la carcinogenèse (Mauviel, 2005; Inagaki et Okazaki, 2007).

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire « VEGF » est également exprimé par les CSH quiescentes (Ishikawa et al., 1999). Sa capacité à induire les mitoses des cellules sinusoidales et endothéliales marque le rôle important des CSH dans l'interaction et le contrôle de l'homéostasie du foie. La voie de signalisation paracrine importante entre les CSH et l'endothélium sinusoidal, induite par le VEGF et la guanylate cyclase soluble pourrait être importante pour l'homéostasie sinusoidal dans le foie normal et la régénération (Wang et al., 2012a, 2012b; Xie et al., 2012).

Les CSH synthétisent d'autres facteurs de croissance qui sont : les IGF, TGF- α , EGF, le facteur de croissance des cellules souches, et le facteur de croissance des fibroblastes, cependant leurs concours est plus importante au moment du développement que de la

régénération du foie (Chan et al., 2013; Chen et al., 2012b; Fujio et al., 1994; Marsden et al., 1992; Meyer et al., 1990; Mullhaupt et al., 1994; Rosenbaum et al., 1995; Tsukamoto et al., 2012; Zindy et al., 1992).

1.3.6.3 L'activation des cellules stellaires hépatiques

Au moment où le foie subit une blessure, l'activation des CSH est l'étape d'importance capitale. Une fois les CSH activées, si la cause de la blessure persiste l'activation est modulée par une multitude des médiateurs (Pierre et al., 2013).

Les marqueurs clés des CSH activées sont :

- Le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF),
- La métalloprotéinase matricielle. (MMP-2),
- La molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1)
- L'actine α -musculaire lisse (α -SMA).

Il faut signaler que lors d'une infection chronique du foie, d'autres modifications sont associées à l'activation des CSH notamment la perte des microvillosités sur les hépatocytes et la perte des fenestrations entre les cellules endothéliales (Friedman 2000).

Les CSH, quant à elles, elles subissent une « activation » qui les fait passer de cellules quiescentes en myofibroblastes qui ont comme principales caractéristiques celles d'être : prolifératifs, fibrogéniques et contractiles. Cette réponse est importante puisqu'elle détermine plusieurs caractères phénotypiques. Les premières séquences d'évènements qui se produisent sont appelés initiation ou encore stade pré-inflammatoire caractérisé par des modifications rapides au niveau de l'expression génique. Les CSH acquièrent à ce stade un phénotype sensible aux cytokines et à d'autres stimuli de leur environnement. Les secondes séquences d'évènements appelé perpétuation englobe les événements cellulaires qui accentuent le phénotype activé par l'expression des différentes cytokines ; cette étape de l'activation provient de la stimulation autocrine et paracrine, ainsi que du remodelage accéléré de la MEC.

Ces nombreux mécanismes permettent aux CSH d'acquérir un phénotype activé. Elles passent des cellules responsables du stockage de la vitamine A aux myofibroblastes responsables du développement de la fibrose dans le foie.

Les différents stades de CSH dans la réponse fibro-hépatique sont décrits dans les sections suivantes.

Activation

Les agressions chroniques entraînent des dommages qui affectent le parenchyme conduisant à l'augmentation des corps apoptotiques, l'activation des cellules de Kupffer, et un remodelage de la MEC. Ces phénomènes ensemble jouent un rôle déclencheur dans l'activation des CSH. Cette dernière se passe en deux phases, l'initiation et la perpétuation, une troisième phase de résolution peut avoir lieu si les causes disparaissent. Pendant la résolution de la fibrose, la perte de l'activation des CSH peut se dérouler de nombreuses manières, la voie apoptotique n'étant pas le seul mécanisme possible. Il a ainsi été montré que les CSH peuvent également entrer en sénescence ou même revenir à un état quiescent (Friedman, 2012; Kisseleva et al., 2012; Troeger et al., 2012).

L'initiation induit un changement dans le phénotype des CSH et des modifications de l'expression des gènes qui rendent les cellules plus réceptives aux modifications de leur environnement ainsi qu'aux stimuli de l'inflammation qui est l'un des premiers signaux permettant l'activation des CSH. La stimulation paracrine par les cellules voisines (cellules endothéliales, plaquettes, cellules immunitaires, et hépatocytes) ainsi que les modifications du tissu conjonctif qui entourent les CSH. Les cellules endothéliales à leur tour peuvent activer les CSH en sécrétant de la fibronectine (Jarnagin et al., 1994) ainsi qu'en activant le TGF- β latent (Kojima et al., 2000), mais aussi en sécrétant un large spectre de médiateurs qui régule la réponse inflammatoire et participe à la communication cellulaire (Smedsrød et al., 2009; Xie et al., 2012). Les effets de la fibronectine sont largement pro-migratoires et non mitogéniques, suggérant que la migration des CSH est une première étape importante dans la réponse aux dommages (Olsen et al., 2012). Les plaquettes participent en sécrétant du TGF- β , ainsi que de l'EGF et le PDGF, le mitogène le plus important des CSH (Bachem et al., 1989; Borkham-Kamphorst et al., 2007). Il est à noter que les macrophages résidents pourraient être la source principale de PDGF, ainsi que des autres médiateurs paracrines qui conduisent à l'activation des CSH (Heymann et al., 2009; Wang et al., 2009).

Prolifération

Le PDGF est le mitogène principal des CSH lors du dommage. Sa sécrétion accrue dans le foie, associé à l'augmentation de l'expression de son récepteur dans les CSH, va leur permettre d'acquérir un phénotype profibrogénique (Borkham-Kamphorst et al., 2007; Pinzani, 2002; Wong et al., 1994), la prolifération induite par le PDGF est modulée aussi par la signalisation du TNF- α via son récepteur (Tarrats et al., 2011). Les CSH sont également sensibles à d'autres facteurs, entre autres le VEGF (Yoshiji et al., 2003), la thrombine, l'EGF, le facteur de croissance des kératinocytes (Steiling et al., 2004; Yu et al., 2003).

Les TIMPs jouent un rôle pro-fibrotique vu leur activité inhibitrice de la dégradation de la MEC, et de plus, ils favorisent la survie des CSH. D'où l'augmentation de leur expression par les cellules étoilées, ce qui induit la prolifération des CSH dépendamment de la voie AKT (Fowell et al., 2011).

Contraction

Lors de lésions chroniques, les sinusoides hépatiques subissent des changements induits par les CSH qui touchent à la fois leur morphologie et leur fonction. Un remodelage radical se produit caractérisé par le dépôt de collagène matriciel, une perte de fenestration et une augmentation en CSH contractiles (Thabut et al., 2011). De plus, on constate un déséquilibre des forces vasoactives caractérisé par un déficit en production de monoxyde d'azote et une augmentation des substances vasoconstrictiles telles que l'ET-1, l'angiotensinogène II, les eicosanoïdes, le peptide natriurétique atrial, la somatostatine et le monoxyde de carbone (Reynaert et al., 2002; Rockey, 2001, 2003; Taura et al., 2008). Tout ce qui précède mène à l'hypertension portale qui s'accompagne d'une augmentation du flux sanguin, augmentation de la résistance intrahépatique, et une désorganisation de l'architecture du parenchyme hépatique.

Dégradation de la matrice extracellulaire.

La fibrose hépatique est un processus qui est caractérisée par le remplacement progressif de la membrane basale normale, composée de collagène de type IV, par du tissu cicatriciel qui contient essentiellement des fibres de collagène de type I. La dégradation précoce de la

matrice est une étape importante de la fibrose pour induire la migration des CSH vers les sites de lésions. Les CSH étant eux-mêmes sources principales de MMP-2, MMP-9 et MMP-13 (Arthur et al., 1992; Han et al., 2007; Milani et al., 1994; Vyas et al., 1995), qui ont des fonctions de collagénases interstitielles et de gélatinases. Peu importe l'implication des MMPs dans la progression de la fibrose, ils peuvent paradoxalement montrer des propriétés anti-fibrotiques. La MMP-2 inhibe la production de collagène de type I par les CSH et les souris déficientes en MMP-2 ont ainsi montré une fibrose hépatique augmentée (Radbill et al., 2011).

De plus, la MMP-2 est capable de réguler l'apoptose des CSH en clivant le domaine extracellulaire de la cadhérine, allant dans le sens d'un rôle anti-fibrotique (Hartland et al., 2009). Certaines activités aberrantes des MMPs *in vivo* pourraient être expliquées par leur action simultanée sur l'activation des macrophages (Gong et al., 2008). La régulation des MMPs est médiée par plusieurs mécanismes. Les TIMPs, qui sont majoritairement exprimés par les CSH, se lient aux MMPs pour les rendre inactifs. De plus, pendant la progression de la fibrose, la MMP-9 et la MMP-13 sont séquestrées au niveau de la chromatine empêchant l'accès des facteurs de transcription NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) et AP-1. Une perturbation de l'acétylation des histones est associée à l'extinction permanente de l'expression des gènes et les CSH activées. On a, entre autres, une augmentation globale de l'histone de l'acétylase-4, ce qui entraîne une diminution de l'acétylation de la zone promotrice de la MMP-9 et la MMP-13, et donc une répression des gènes (Qin et Han, 2010).

Bien que la source des MMPs qui dégradent la MEC dans le foie soit incertaine, les découvertes récentes s'orientent vers une sous-population de macrophages ayant un potentiel fibrolytique. En effet, une étude récente a conduit à la caractérisation d'un sous-type spécifique de macrophages qui a comme marqueur de surface Ly6C. Ceux-ci sécrètent une panoplie de protéases ayant la capacité de dégrader la MEC (Ramachandran et Iredale, 2012; Ramachandran et al., 2012).

La fibrogénèse

La production de certaines composantes de la matrice extracellulaire, en particulier le collagène de type I, est un marqueur des CSH activées. La production du collagène de type I est régulée à la fois de manière transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (Lindquist et al., 2000; Manojlovic et Stefanovic, 2012; Parsons et al., 2011; Stefanovic et al., 1997, 1999). Le TGF- β 1 est l'élément majeur de ce processus par des voies autocrines ou paracrines qui stimulent la production de la MEC dans nombreuses maladies fibrotiques y compris dans la fibrose hépatique. (Gao et Brigstock, 2004; Gressner et Gressner, 2008; Huang et Brigstock, 2012, A.M. Gressner 1996). Ainsi les maladies fibrotiques sont associées à une augmentation des taux de TGF- β , qui inhibent la dégradation de la MEC en médiant à la baisse l'expression de MMPs tandis que modulent la surexpression de TIMP-1 (Jeong 2008, Dooley et Dijke 2012).

Le TGF- β est un facteur majeur impliqué dans la croissance des hépatocytes et dans l'apoptose des cellules épithéliales. Il stimule la prolifération des fibroblastes, la production de la MEC et produit une réponse fibrotique dans différents tissus in vivo (Leask et Abraham, 2004). Dans le foie, le TGF- β module à la hausse la transdifférenciation des CSH en myofibroblastes (Gressner, 1996).

L'interruption de la signalisation du TGF- β freine la progression de la fibrose hépatique chez les animaux de laboratoire (Yata et al 2002), tandis que sa surexpression dans les animaux transgéniques inhibe l'apoptose CSH et favorise l'induction d'un type de CSH capable de synthétiser des quantités énormes de protéines matricielles comme le collagène I, III, IV et la fibronectine (Kanzler et al., 1999). Des études utilisant un système d'expression génique régulé par la tétracycline, qui permet aux plasmiques de TGF- β d'être régulés chimiquement, ont montré que le TGF- β inhibe les MMPs en régulant l'expression de TIMP-1, ce qui stoppe la progression de la LF (Ueberham et al., 2003).

La liste des facteurs qui contribuent à la fibrogénèse est exhaustive, faisant intervenir des molécules de signalisation, des chimiokines, des molécules de stress cellulaire (Sahin et al., 2010). Par exemple, l'ostéopontine, une molécule d'adhérence produite par les CSH qui

active l'expression du collagène I (Urtasun et al., 2012). Les récepteurs aux chimiokines profibrotiques se trouvant à la surface des CSH, incluant le CXCR4 (Hong et al., 2009), le CCR1, le CCR5 (Seki et al., 2009a), le CXCR2 (Stefanovic et al., 2005), et le CCR2 (Seki et al., 2009b).

Le chimiotactisme

Lorsque les CSH subissent le chimiotactisme, elles expriment un large spectre de récepteurs aux médiateurs chimiotactiques. Les médiateurs les plus impliqués sont le PDGF (Ikeda et al., 1999; Kinnman et al., 2000), le VEGF, l'Ang-1 (Novo et al., 2007), le TGF- β 1, l'EGF (Yang et al., 2003), le BFGF (Fibbi et al., 2001), le CCL2 (Marra et al., 1999), le CXCR 4 (Sawitza et al., 2009) et de s ligands spécifiques du CXCR3 (Bonacchi et al., 2001). Ces médiateurs permettent aux CSH de rejoindre les zones endommagées du foie, où elles prolifèrent, synthétisent la MEC et participent à la réparation du tissu. Elles subissent une apoptose si la blessure est résolue, mais une fois que la blessure persiste; les CSH entraînent le développement d'une fibrose et d'une cirrhose subséquente (Melton et Yee, 2007). Cette migration dépend de l'état de la MEC, de sa composition ainsi que des interactions cellule-matrice. Il a été démontré que la stimulation des CSH avec TGF- β 1, PDGF- β et le collagène de type 1 entraîne une augmentation de leur capacité migratoire dépendante de la MMP-2 et des récepteurs intégrines (C. Yang et al., 2003). L'endothéline-1 (ET-1) et la protéine chimiotactique des monocytes (MCP-1) induisent également la chimiotaxie des CSH (Ikeda et al., 1999, Marra et al., 1999, Ramón Bataller et Brenner, 2001). Le désassemblage de l'adhérence focale est nécessaire pour le chimiotactisme des cellules étoilées en réponse au PDGF (Melton et al., 2007). Il a été démontré aussi que le collagène de type 4 inhibe la migration des CSH (Yang et al., 2008).

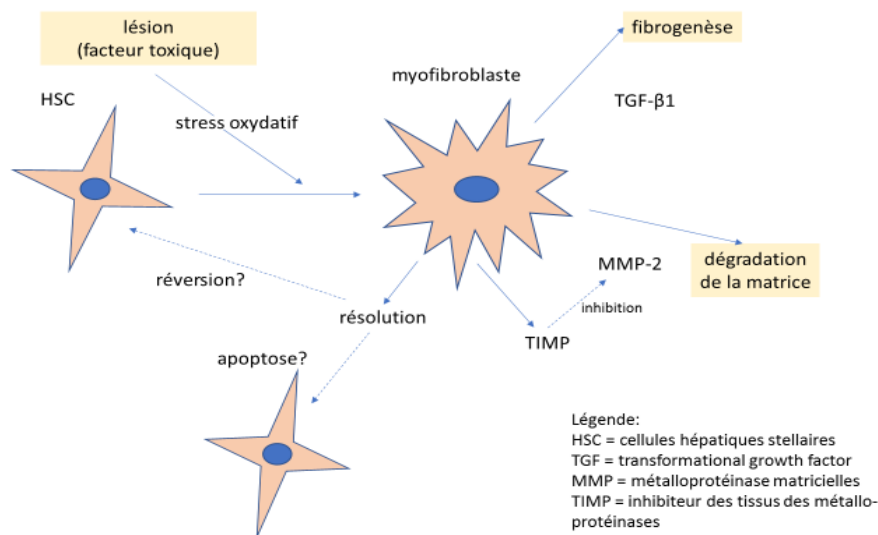


Figure 4 : L'activation des cellules stellaires hépatiques :

Les voies d'activation du HSC consistent en deux phases; l'une est la phase d'initiation et perpétuation. L'initiation est provoquée par des stimuli cas de blessure, les cellules étoilées sont activées. Le problème peut se résoudre vite si les causes disparaissent. Si la blessure est chronique, les cellules étoilées produisent des facteurs de croissance et prolifèrent. Aussi, elles vont produire des cytokines pour évoluer vers la fibrogénèse et produire les TIMPs 1 et 2 pour altérer la dégradation de la MEC. Les CSH activées peuvent induire l'inflammation, et interagissent ainsi avec les cellules de l'inflammation qui à leur tour influencent et contribuent à la fibrogénèse.

1.4 Les stades de la fibrose hépatique

Il existe plusieurs stadifications de la fibrose hépatique entre-autre la stadification selon **METAVIR** se basant sur l'ampleur des dommages subis par le foie du point de vue histologique, la fibrose peut-être moins ou plus importante, la stadification de METAVIR qui va dès F0 à F4 donne une illustration sur les stades de la gravité croissante de la fibrose (Tableau2).

Nous avons les caractéristiques suivantes selon les stades:

- F0: Le parenchyme hépatique est normal.
- F1: Le parenchyme hépatique est caractérisé par une déposition du collagène autour des triades portails.
- F2: La déposition se lie entre les triades portales mais en faible quantité.
- F3: La liaison de déposition en collagène devient importante.

- F4 : Presque tout le parenchyme est constitué de collagène qui se retrouve également autour de la veine centrale (Faria et al., 2009).

Tableau2 :**Évaluation des stades histologiques de fibrose par Fibrotest** (Leroy et Hilleret, 2005)

Fibrotest	METAVIR
0,75-1,00	F4
0,73-0,74	F3-F4
0,59-0,72	F3
0,49-0,58	F2
0,32-0,48	F1-F2
0,28-0,31	F1
0,22-0,27	F0-F1
0,00-0,21	F0

Il s'avère important d'évaluer le degré de fibrose hépatique pour une meilleure prise en charge des maladies chroniques du foie car il y a un risque d'évolution vers la cirrhose. La biopsie hépatique, qui permet de faire un aperçu histologique du foie, reste le diagnostic de dernière intention ou de référence compte tenu de ses inconvénients par exemple son caractère invasif (Leroy et Hilleret, 2005).

Dû à ces inconvénients, des nombreux chercheurs proposent des méthodes alternatives non-inversives qui servent à évaluer la gravité de la fibrose, leur caractéristique est qu'ils sont des paramètres cliniques de routine incluant les résultats d'examen physique du malade, le dosage de transaminases, les tests de radiographie.

1.5 Le traitement de la fibrose hépatique

Étant à l'époque de la médecine préventive, il est préférable que la thérapie soit administrée avant l'étape avancée de la fibrose donc au stade de la cirrhose. La seule thérapie proposée présentement est la transplantation . Celle-ci est offerte de façon limitée aux patients à cause

de la pénurie d'organes et car elle peut causer un pourcentage élevé de la morbidité. A cause de ces inconvénients, il s'avère qu'une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sont impliqués dans la progression de la fibrose hépatique ouvrirait d'autres pistes de traitement. (Pierre et al., 2013)

Actuellement, voici quelques thérapies mises en place chez les modèles précliniques et dans les essais cliniques chez l'humain.

- ❖ Le ciblage des myofibroblastes et de la voie de TGF- β ; dans cette famille nous avons :
 - La Perfénidone (Esbriet) et le Nintedanib qui sont des anti-cicatrisants ou anti-fibrotiques qui en ciblant ces voies diminuent la production des médiateurs pro-inflammatoires et sont utilisés dans la fibrose pulmonaire.
 - L'anticorps monoclonal TGF- β ou le Fresolimumab qui est utilisé dans le traitement des patients atteints de la fibrose pulmonaire interstitielle.
- ❖ Le Borbezomib est un inhibiteur protéasome qui induit l'apoptose des CSH.
- ❖ L'INF- γ 1b, prouvé efficace dans le traitement de l'hépatite B ainsi que l'hépatite C car c'est une cytokine anti-fibrotique efficace. Tandis qu'un autre essai clinique prouve qu'il est moins efficace dans la fibrose hépatique à un stade avancé.
- ❖ L'inhibiteur de la tyrosine kinase mésylate d'imatinib (Gleevec), qui inhibe le récepteur du PDGF n'a pas été capable de restaurer la fonction pulmonaire.
- ❖ Le BIBF 1120, qui inhibe triplement l'angiokinase (VEGFR, PRGFR, FGFR), a une action efficace chez les patients atteints de la fibrose pulmonaire interstitielle (Richeldi et al., 2011).
- ❖ Le ruxolitinib (NCB018424), un inhibiteur sélectif de la Janus kinase 1 (JAK1) et JAK2, est utilisé le cas de la myélofibrose (Verstovsek et al., 2010).
- ❖ Les Anticorps monoclonaux contre le TNF- α (infiximab et étanarcept), CCL2, IL-1 et IL-10, Arg1 sont aussi testés dans les essais cliniques.

1.6 Réversibilité de la fibrose hépatique

La fibrose hépatique est un processus de cicatrisation réversible, alors que la cirrhose, qui est la conséquence de cette fibrose au cours du temps, est généralement irréversible. Voilà pourquoi, les efforts sont focalisés sur la compréhension de la fibrose en se basant sur les

événements qui concourent à l'accumulation précoce de la cicatrice dans le but d'identifier des cibles thérapeutiques pour arrêter ou ralentir sa progression.

Le modèle chimique de la fibrose hépatique consiste à utiliser les produits chimiques toxiques, une fois en contact avec le foie va induire l'apoptose des hépatocytes. Ce modèle est beaucoup utilisé pour les études au laboratoire. Dans ce modèle la notion de dose à administrer à l'animal est très importante car en cas surdosage l'atteinte aiguë peut provoquer la mort de l'animal. L'usage du tétrachlorure de carbone (CCl₄), dont le mécanisme d'action induit principalement une fibrose péricentrale formant des ponts chez la souris, qui apparaît entre 4-7 semaines d'injection intrapéritonéale (IP) (Scholten et al., 2015). Le N-Diéthylnitrosamine (DEN) ou le N-Diméthylnitrosamine (DMN), sont deux agents hépatotoxiques qui induisent aussi la fibrose hépatique. La dose à administrer est de 10 UI / kg de poids corporel, trois injections intrapéritonéales par semaine pendant 4 semaines (Hyon et al., 2011). L'atteinte hépatique passe par l'hydroxylation de ces molécules lors de leur biotransformation par le cytochrome P450 dans les hépatocytes.

Composition de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire en tant que composante comprenant plusieurs éléments et dynamique du foie assume ainsi plusieurs fonctions (Wells et al., 2008).

Les protéines de la matrice extracellulaire

Les protéines faisant parties de la composition de la matrice extracellulaire jouent des rôles dans l'architecture et la mécanique de celle-ci, accordant aux cellules une résistance et une capacité à se reconstruire. Ces protéines régulent la diffusion et le flux vasculaire, et modulent la mobilité cellulaire (Wells, 2008).

Elles régulent aussi la signalisation en étant ligands des récepteurs, elles ont comme sources principales les hépatocytes (Discher, 2005).

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau moléculaire très organisé, composé de collagènes, de glycosaminoglycanes, de protéoglycanes et de glycoprotéines, qui permet l'intégrité fonctionnelle et structurale du parenchyme hépatique.

Initiation

Cette phase d'initiation est activée par plusieurs stimuli qui influencent ou accentuent l'activation des CSH menant à une cascade de réponses cellulaires. Ces stimuli sont soit des débris d'hépatocytes, des cellules endothéliales et des cellules de Kupffer qui sont localisées à proximité des myofibroblastes dans les zones de tissus cicatriciels pendant l'activation. Les deux dernières cellules sont une source importante des réactifs intermédiaire d'oxygène (ROI) affectant rapidement la composition de la MEC.

Matrice Extra-Cellulaire (MEC) dans le foie normal

La principale fonction de la MEC est de fournir un soutien de structure aux cellules, mais aussi de réguler certains processus tels que la croissance, la migration, la différenciation, la survie, l'homéostasie et la morphogenèse des cellules.

L'activation des cellules stellaires est modulée par les cytokines profibrotiques TGF- β 1 et le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) 4, qui sont caractéristiques de la fibrogénèse tandis que les cytokines antifibrotiques, qui comprennent l'interleukine-10 et l'interféron γ (IFN γ). 5, 6, 7, 8, 9, ont une activité antifibrotique. IL-10 inhibe la transcription du collagène de type I en favorisant l'expression de la collagénase raison pour laquelle il a été suggéré pour des études *in vitro* des CSH. Les anticorps neutralisants contre l'IL-10 régulent négativement l'accumulation de la matrice, démontrée par la régression de la fibrose après leur administration chez les modèles expérimentaux ainsi que l'augmentation de la fibrose chez des souris knock-out IL-10 après induction toxique. Le dépôt de la matrice extracellulaire engendre la modification de l'architecture du parenchyme hépatique conduisant ainsi à la cicatrisation formant un tissu fibreux riche en collagène fibrillaire.

1.7 Rôles des macrophages dans la fibrose hépatique

Toutes les maladies hépatiques, notamment les maladies hépatiques chroniques d'origine virale, d'origine alcoolique, due à l'obésité, maladies auto-immunes et la fibrose hépatique à chacune de leurs étapes, sont caractérisées par l'inflammation qui est associée au développement de la maladie. Au cours des 10 dernières années, plusieurs études ont focalisé leurs intérêts d'étude sur la médiation de l'inflammation hépatique lors d'une fibrose (Seki et Schwabe, 2015). D'où l'implication du système immunitaire par l'intervention des

plusieurs cellules dont les macrophages. Les CSH activées peuvent induire l'inflammation, et interagissent ainsi avec les cellules de l'immunité qui à leur tour influencent et contribuent à la fibrogénèse. Les macrophages sont des cellules principales de l'inflammation induites lors de la fibrogénèse (Lee et Friedman, 2011). Il a été démontré que dans un foie fibrotique, les macrophages sont autour des myofibroblastes activés, donc dans la zone lésée, et constituent une entité capitale de la réponse fibrogénique car leur diminution pharmacologique ou génétique arrête la fibrose (Duffield et al., 2005).

Le foie étant exposé quotidiennement à des antigènes provenant de la flore commensale intestinale, le système immunitaire inné est hautement actif afin d'empêcher l'activation des réponses inflammatoires contre ces pathogènes indispensables. Les macrophages hépatiques résidents à cause de leur propriété phagocytaire et leur capacité à libérer plusieurs médiateurs immunitaires locaux répondent à ces stimuli et favorisent la tolérance en amortissant par exemple l'activation de cellules T.

Les macrophages jouent un rôle important dans la dégradation de la MEC, ils sont profibrogéniques pendant la progression de la fibrose mais antifibrotique au cours de la résolution de la fibrose. Bien que les principales sources d'activité de dégradation de la matrice soient incertaines, il semble de plus en plus probable que les macrophages associés aux cicatrices et les cellules étoilées soient des sources de collagénases interstitielles. En même temps, une diminution du TIMP-1 favorise l'apoptose des myofibroblastes fibrogènes (Duffield et Iredale, 1977).

Les macrophages et la fibrose hépatique

Les études expérimentales récentes ont proposé que les macrophages hépatiques ou les cellules de Kupffer soient des cibles potentielles dans la lutte contre la fibrose car elles sont au cœur des lésions hépatiques et de la pathogénèse de la maladie chronique du foie. Ces macrophages sont caractérisés par leur hétérogénéité remplissant ainsi diverses fonctions tant dans l'homéostasie, la progression et pendant la régression de la lésion. Ils jouent des rôles centraux dans l'initiation, lors de la perpétuation de l'inflammation ainsi que dans sa résolution (Tacke et Zimmermann, 2014).

Les macrophages libérés de la moelle osseuse sous forme de monocytes immatures, sont déversés dans la circulation sanguine, puis migrent vers les tissus où ils subissent leur différenciation en macrophages résidents, il y a ainsi les cellules de Kupffer dans le foie, les macrophages alvéolaires dans les poumons et les ostéoclastes dans l'os. Ces cellules différenciées vont jouer plusieurs fonctions capitales notamment dans le remodelage des tissus, l'inflammation et l'immunité en remplissant le rôle dans la phagocytose, la cytotoxicité et la sécrétion d'une panoplie de cytokines, facteurs de croissance, lysozymes, protéases, composants du complément, facteurs de coagulation et prostaglandines.

Les macrophages jouent deux rôles qui sont antagonistes lors de la fibrose hépatique : dans la phase d'initiation ils sont capables de produire des cytokines (TGF- β , IL-1 β) et le facteur de croissance PDGF qui activent les cellules stellaires hépatiques; tandis que dans la phase de résolution, les macrophages produisent IL-10 qui bloque l'activation de CSH conduisant ainsi à la résolution de l'inflammation.

Initiation et perpétuation de l'inflammation hépatique

En réponse à une agression au niveau du foie, les cellules étoilées sont activées. Le problème peut se résoudre vite si les causes disparaissent. Mais en cas d'une blessure chronique, les cellules étoilées vont produire des facteurs de croissance et proliférer. Ils vont aussi produire des cytokines pour évoluer vers la fibrogénèse et les TIMP1 et TIMP2 enfin d'altérer la dégradation de la MEC. La phase d'initiation correspond aux changements apportés dans l'expression géniques et au phénotype qui entraîne une sensibilité des CSH aux cytokines et autres facteurs se trouvant dans son environnement. La phase de perpétuation est la résultante de tous ces stimuli sur le phénotype activé des CSH conduisant au dépôt de la MEC riche en collagène fibrillaire et donc à la fibrose. L'activation se traduit par une transdifférenciation de la CSH riche en vitamine en un myofibroblaste actif qui exprime des récepteurs mitogènes et contractiles et qui est pauvre en vitamine A.

1.7.1 Phase de progression de la fibrose hépatique et implication des macrophages

La fibrose hépatique qui s'installe n'est pas un processus statique, mais plutôt un processus dynamique avec une balance entre la synthèse et la dégradation des composants de la MEC.

Ces composants sont dégradés par les MMP. Au cours de la fibrose, il y a diminution de ces enzymes, qui entraîne le remplacement du tissu normal par du tissu cicatriciel ayant comme caractéristique principale la baisse de la dégradation du collagène de type I. Le collagène et les enzymes protéolytiques sont produits par les myofibroblastes, qui dérivent des cellules étoilées activées, alors que les cellules de Kupffer activées ou les cellules biliaires sont la source principale de cytokines et de facteurs de croissance qui provoquent l'activation des cellules étoilées.

L'un des principaux déterminants de la fibrose progressive est l'incapacité à dégrader la matrice cicatricielle accrue, ou interstitielle, formant des fibrilles. MMP-1 est la principale protéase qui peut dégrader le collagène de type I, le collagène principal dans le foie fibrotique. Cependant, les sources de cette enzyme ne sont pas aussi clairement établies que pour les collagénases de type IV, MMP-2 et MMP-9. Les cellules stellaires expriment des niveaux modestes d'ARNm de MMP-1 et, il est donc peu probable que celle-ci soit la collagénase la plus importante dans le processus de résorption de la matrice lorsque la fibrose hépatique régresse. Des protéases interstitielles alternatives pourraient inclure soit MMP1 ou MMP-2, qui présente également une activité de collagénase interstitielle.

Le rôle des cellules de Kupffer dans l'activation des CSH et leur activité fibrogénique est dépendant de leur activation passant par les médiateurs qui sont soit des radicaux libres, du TNF- α , et du TGF- β (Friedman, 2008a). Bien aussi, les macrophages hépatiques sont impliqués dans l'hépatotoxicité moduler par un surdosage du paracétamol, en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires le TNF- α , l'IL-1 β ainsi que le monoxyde d'azote (NO) (Laskin et Pendino, 1995).

1.7.2 Phase de régression de la fibrose hépatique

Lors d'une lésion chronique du foie, les macrophages Ly6C^{hi} parviennent à adopter un phénotype réparateur qui est caractérisé par l'expression de Ly6C^{lo} et la capacité de dégrader les protéines extracellulaires en excès dans la MEC par les MMP (MMP-9, -12, -13) et ainsi induire l'apoptose. Le CX3CL1 de son côté favorise la survie des macrophages

intrahépatiques et induit la maturation des cellules Ly6C⁺. Ces mécanismes aboutissent à la dégradation de la MEC au cours de la résolution du foie.

Une étude *in vivo* a permis d'élucider le rôle fonctionnel des macrophages dans la résolution de la fibrose dans les modèles des lésions hépatiques provoquées par le thiocétamide (TAA) avec le gadolinium chloride (GdCl₃), qui a la capacité d'inhiber les fonctions des macrophages. Cette étude a démontré qu'en traitant avec le GdCl₃, il y a diminution du nombre de macrophages dans les lésions hépatiques et inhibition de l'expression de l'ARNm du TGF-β1 dans les macrophages. Cette diminution de macrophages corrèle avec la diminution de l'activation des myofibroblastes et contribue à réduire la progression de la fibrose hépatique (Ide et al., 2005). Une autre étude d'importance capitale a été effectuée à l'aide de souris transgéniques Cd11b-DTR ayant une fibrose induite par le CCl₄. Dans cette étude, la déplétion des macrophages se fait en deux temps; chez les unes pendant le traitement au CCl₄ et chez les autres après le traitement au CCl₄ donc pendant la phase de réparation du tissu. Les conclusions suivantes découlent de cette étude : premièrement, si la déplétion est effectuée pendant la phase de l'agression au CCl₄ il se remarque une diminution des myofibroblastes et une cicatrisation amoindrie démontrant le rôle pro-fibrogénique des macrophages, deuxièmement, une déplétion effectuée pendant la phase de réparation induit la non-dégradation de la MEC suggérant ainsi le rôle régulateurs des macrophages dans la fibrose hépatique (Duffield et al., 2005). Cette étude prouve clairement que des sous-populations de macrophages sont présentes et dans le même tissu et qu'ils jouent des rôles importants tant dans la phase aigüe que dans la phase de réparation tissulaire.

1.7.3 La polarisation des macrophages

Vu l'hétérogénéité des macrophages due à une grande diversité de cytokines libérées, de leurs marqueurs de surface et de leurs profils transcriptionnels, ces cellules ont été classées selon leurs fonctions et leurs phénotypes en macrophages M1 «pro-inflammatoires » et M2 « immunorégulateurs », bien que cette simple nomenclature n'arrive pas à traduire reflète pas complètement la biologie des sous-populations de macrophages (Friedman, 2008). Par conséquent, les macrophages M2 sont maintenant catégorisés en sous-types favorisant la

cicatrisation ou l'anti-inflammatoire et un autre sous-type allant dans le sens de favoriser l'inflammation dans d'autres contextes.

1.8 La famille des protéines SOCS

La signalisation des cytokines s'avère très importante pour l'homéostasie de l'organisme de tout être vivant, ainsi la durée et l'intensité de cette signalisation est importante enfin de produire des réponses qui sont suffisantes, voilà pourquoi il y a des voies de régulation négatives qui concourent au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Pour ce, plusieurs mécanismes sont mis en place pour régulariser ces signalisations. Notamment, les protéines inhibitrices de l'activation des STATS (PIAS) des récepteurs solubles, les protéines de l'organisme pour le contrôle des voies de signalisation de cytokines et des facteurs de croissance et les protéines Suppressor Of Cytokine Signaling (SOCS) (Baetz et al., 2017). Dans ce travail, nous allons nous intéresser à la famille des protéines SOCS.

Au moment de la fixation de nombreuses cytokines et facteurs de croissance à leurs récepteurs respectifs, il y a activation d'une cascade des voies de signalisations intracellulaires qui induisent soit la prolifération, la différenciation, la survie ou l'activation fonctionnelle. Leur signalisation excessive peut mener à la perte de la régulation et peut contribuer à l'implantation de plusieurs maladies. Une signalisation excessive est contrôlée par de nombreux mécanismes intrinsèques cellulaires. Ces mécanismes impliquent un groupe de protéines SOCS, qui agissent de manière rétro-inhibition (Sullivan et al., 2007). L'expression des membres de la famille des SOCS, induite par les cytokines, présente un profil spécifique aux tissus (Starr et al., 1997; Larsen, 2002) et varie en fonction de la lignée cellulaire et du tissu étudié (Walter et Hospital, 2001).

En bref, la famille de SOCS est un ensemble des protéines qui ont comme rôle principale la régulation négative de voies de signalisation intracellulaires.

1.8.1 La structure de la famille des protéines SOCS

Les protéines SOCS sont généralement des petites protéines pesantes entre 20 à 50 kDa (Trengeve et Ward, 2013). Cette famille est composée de 8 protéines qui sont CIS et SOCS1

à 7, ces protéines partagent deux à deux une structure et fonction similaire chez les mammifères de la manière suivante : CIS / SOCS2, SOCS1 / SOCS3, SOCS4 / SOCS5 et SOCS6 / SOCS7 (Tregrove et Ward, 2013).

En ce qui concerne la structure, les protéines de cette famille ont toutes un domaine central conservé appelé domaine d'homologie Src (SH2), un domaine C-terminal appelé boîte SOCS et une région N-terminale qui est marquée par la variabilité de longueur dans chaque sous-groupe (Inagaki-ohara et al., 2013; Fujimoto et Nika, 2003; Sasi et al., 2014). La région N-terminale des protéines SOCS1 et SOCS3 héberge une région inhibitrice de la kinase (KIR) toujours dans la partie pre-SH2.

1.8.2 Rôle des domaines des protéines SOCS

Comme nous l'avons vu précédemment, les membres des protéines SOCS sont constitués de 3 parties qui jouent chacune un rôle important comme décrit ci-dessous. Néanmoins, il est important de noter que de ces 3 domaines ce sont les domaines SH2 et SOCS qui jouent des rôles très importants.

Les domaines SH2 sont des plis protéiques ayant environ 100 acides aminés contenant 2 hélices α et sept branches β disposés dans l'ordre $\beta\alpha\beta\beta\beta\beta\alpha\beta$ (Machida et Mayer, 2005). Ils ont la particularité de se lier spécifiquement à leurs ligands d'une manière dépendante de la phosphotyrosine (Liu et al., 2012; Pawson et al., 2004). Le domaine SH2 permet aux protéines SOCS de se lier aux résidus tyrosines qui sont phosphorylés au niveau des boucles d'activation JAK kinase enfin d'inhiber la signalisation en aval. (Endo et al., 1997; Yasukawa, 1999). Notez qu'une particularité s'applique au domaine SH2 de SOCS1 qui peut se lier aux résidus tyrosine de façon non dépendante de la phosphorylation (Rottapel et al., 2002). Ce domaine est celui qui détermine la cible de chaque membre de la famille de ces protéines.

Le domaine conservé à l'extrémité C-terminal appelé boîte SOCS ou SOCS box, est composé de 40 AA ayant deux sites servant de base pour les interactions. Ces sites sont BC-box et Cul-box. Ce domaine est responsable du recrutement du complexe E3 ubiquitine ligase par

interaction avec les Elogines B et C, Cullin-5 ou 2 et aussi avec Rbx-1 (Kamura et al., 2004). La plupart des protéines ayant des boîtes SOCS agissent comme des modulateurs qui reconnaissent des substrats pour une polyubiquitination et une dégradation par le protéasome 26S (Linossi et Nicholson, 2012).

1.8.3 Mécanismes d'action des protéines SOCS

L'expression de ces protéines est induite par les cytokines pour qui elles deviennent régulateurs négatifs. Donc, elles inhibent la réponse à ces cytokines en s'impliquant dans le contrôle négatif de la voie JAK-STAT. De cette façon, elles deviennent modulateurs potentiels des réponses inflammatoires (Gisselbrecht, 1999). Les protéines JAKs se lient aux récepteurs par leurs domaines FERM qui les différencient entre elles et déterminent leurs spécificités : JAK-récepteur. Lorsque la cytokine se lie à son récepteur, ce dernier subit une oligomérisation induisant le rapprochement des chaînes qui se traduit par l'autophosphorylation et/ou la transphosphorylation des JAKs qui s'attachent au récepteur. En même temps, les JAKs phosphorylent les récepteurs sur leurs résidus tyrosines, ces résidus recrutent à leur tour les protéines STATs par leur domaines SH2. Les STATs se phosphorylent sur leurs résidus tyrosines kinases par les JAKs. Ces STATs dimérisent, migrent vers le noyau où en tant que facteurs de transcription ils vont transcrire des gènes, dont les SOCS. Les protéines SOCS transcrites vont se fixer par compétition sur les résidus tyrosines du récepteur inhibant directement le récepteur des cytokines et en atténuant la transduction de signalisation, il cible la protéine JAK pour la dégradation et empêchant l'interaction entre STAT et JAK(Figure 5) (Zhang - 2012).

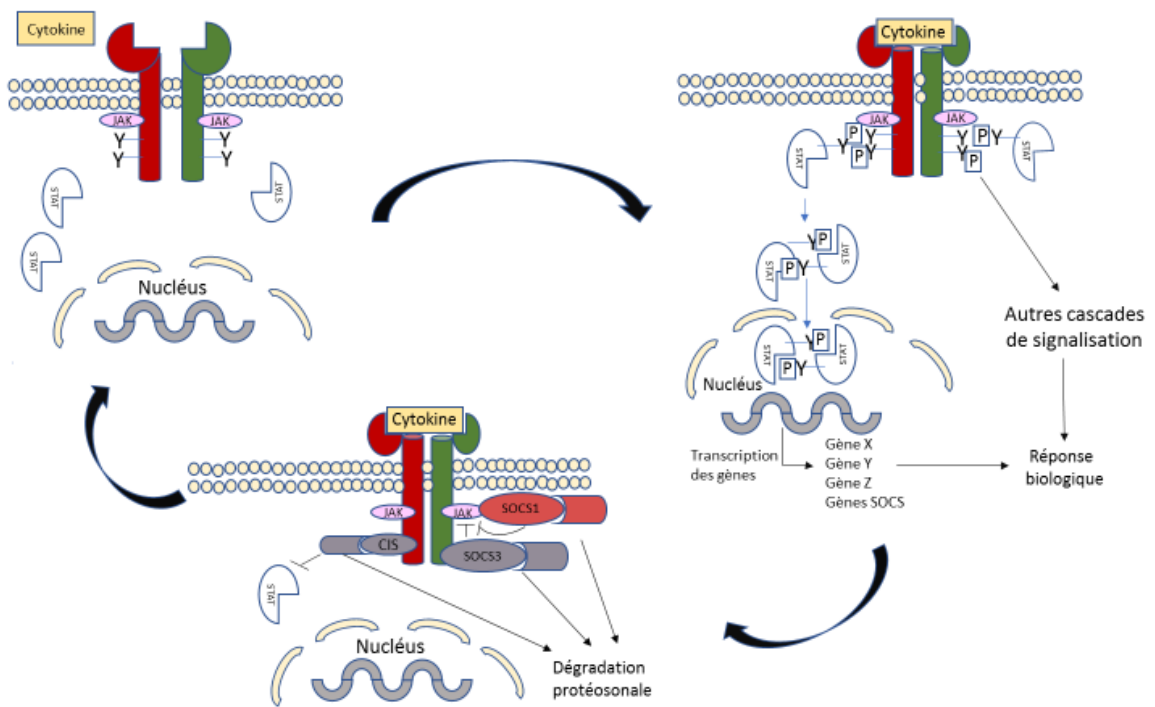


Figure 5. Mécanismes inhibiteurs des protéines SOCS.

La signalisation de la cytokine induit l'expression des protéines SOCS par la voie de signalisation JAK-STAT. Les protéines SOCS induites bloquent l'interaction des STAT avec les récepteurs par encombrement stérique ou compétition via la liaison médiée par le SH2 aux JAKs et aux récepteurs de cytokines, ou inhibent l'activité catalytique des JAK en se liant via les régions KIR et SH2. Abréviations : CIS, contenant SH2 inducible par les cytokines protéine; JAB, protéine JAK-binding ; SSI, inhibiteur STAT induit par STAT.

1.9 SOCS1

Le suppresseur de la signalisation des cytokines 1, appelé JAB, ou SSI-1 lors de sa découverte, régule la signalisation des cytokines par la voie de la Janus kinase (JAK). Son

induction est rapide à cause de sa stimulation par plusieurs cytokines de type I et II (Id, 2016). Cette protéine a été découverte en 1997 à la suite d'expériences de trois groupes de chercheurs : le premier groupe a utilisé une molécule d'ADN codant pour SOCS1 et a observé qu'à l'aide de son domaine SH2, SOCS a pu inhiber la différenciation des macrophages en phénotype M1 induit par IL-6 dans les leucémies monocytaires de souris. L'expression de la protéine SOCS1 a inhibé également la phosphorylation du récepteur modulé par l'IL-6 et l'activation de la STAT (Starr et al., 1997). Le deuxième groupe a utilisé le SOCS1 sous le nom de STAT-inhibiteur STAT (SSI), reconnu par un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine SH2 de STAT3 (Naka et al., 1997). Le troisième groupe a démontré que SOCS1 est une protéine responsable de la régulation négative de la voie JAK-STAT induite par les cytokines car elle se fixe sur le site catalytique de JAK, cette expérience a été faite sur deux hybrides de levures (Endo et al., 1997).

La protéine SOCS1 a pour rôle de réguler négativement la signalisation des certaines cytokines ou carrément d'éteindre la signalisation de ces cytokines. Comme on peut le déduire d'après son nom, SOCS1 est une protéine qui a le pouvoir d'inhiber la phosphorylation et le fonctionnement de JAK. La protéine SOCS1 a pour cible aussi la dégradation des protéines par les protéasomes. (Fukushima et al., 2003). La protéine SOCS1 est identifié comme étant capable de lier et inhiber les 4 membres de kinases de la famille JAK notamment : JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk-2 (Fukushima et al., 2003). Cependant, il a été aussi démontré que c'est la région pré-SH2 du SOCS1, comprenant 24 acides aminés, qui facilitent cette haute affinité aux protéines JAKs, permettant, ainsi l'inhibition de son activité enzymatique. Dans son interaction avec le JAK2, le domaine SH2 de SOCS-1 se lie à un domaine JH1 de JAK2 et bloque la phosphorylation de JAK2, diminuant ainsi la transduction de signaux et activateurs de transcription (STAT) (Yasukawa et al., 1999). Il a été prouvé que SOCS-1 parvient à inhiber in vitro plusieurs voies de signalisations chez les cellules du thymus et celles de la rate (Starr et al., 1997), SOCS1 régule négativement les voies de signalisation en aval de l'IFN α , IFN- γ , EPO, PRL, GH, LIF, TNF- α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, EPO, TPO et TSLP. SOCS1, par son domaine SH2, exerce une inhibition compétitive avec les molécules STATs afin de se lier aux résidus tyrosines

phosphorylés du récepteur au moment de son activation. Cet effet a pour but d'arrêter la signalisation par rétrocontrôle négatif.

1.9.1 Le SOCS1 et la répression des tumeurs

Après plusieurs années de ces dernières années sur la structure et la fonction des protéines SOCS, il ressort deux hypothèses dont la première qui stipule que SOCS1 et SOCS3 sont intimement liés à la prolifération des cellules cancéreuses, et à l'inflammation liée au cancer ; ainsi, la surexpression de SOCS1 et SOCS3 peut être utilisée à des fins thérapeutiques. La deuxième hypothèse suggère que la déplétion de SOCS1 dans des cellules dendritiques (DC) ou des CTL, qui a été inefficace pour rendre optimale la présentation qui est affectée, d'antigènes et donc l'immunité anti-tumorale. (Inagaki-ohara et al., 2013). Par contre la déplétion de SOCS1 dans les macrophages stimule de façon optimale l'immunité antitumorale (Zhang, 2012).

Les résultats publiés de notre laboratoire montrent que le gène SOCS1 qui code pour le suppresseur de la signalisation des cytokines 1 est souvent réprimé dans le carcinome hépatocellulaire (HCC), ce qui fait que SOCS1 est maintenant reconnu comme un suppresseur de tumeur dans le foie. SOCS1 est connu aussi par sa capacité à inhiber la signalisation de cytokines pro-inflammatoires en favorisant l'activation du suppresseur de tumeur p53. Il a été mis en évidence la formation des nodules tumoraux remarquables en nombre et en taille au niveau du foie après traitement au diéthylnitrosamine (DEN) chez des souris déficientes en SOCS1 (Gui et al., 2014). Notre laboratoire a généré trois types de lignées cellulaires stables provenant d'une lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire de souris, les Hepa1-6 : une portant un vecteur vide, une lignée avec SOCS1 sauvage (SOCS1-WT, Hepa-SOCS1, Hepa-S) et une avec expression d'une mutation au niveau du domaine SH2 (Hepa-R105KSOCS1, Hepa-R). Il s'est avéré que la lignée avec la mutation ne pouvait pas inhiber la signalisation des cytokines alors que les cellules tumorales Hepa ayant le type sauvage de SOCS1 sont capables d'inhiber la signalisation des cytokines pro-inflammatoires.

1.9.2 SOCS1 et le système immunitaire

SOCS1 fonctionne le plus classiquement pour inhiber la signalisation de l'IFN en atténuant la signalisation JAK/STAT. Une étude in vivo a pu démontrer son rôle régulateur de

signalisation des cytokines et de la réponse immunitaire, le travail de ce groupe a consisté à utiliser des souris déficientes en SOCS1 qui ont développé une inflammation grave, mais ont été résistantes aux infections virales. En revanche, en utilisant les anticorps neutralisant l'interféron de type I et les souris déficientes en $INF\gamma$, le groupe a pu prouver que la carence en SOCS1 aggrave les effets antiviraux et pro-inflammatoires (Fenner et al., 2006).

La protéine SOCS1 a la particularité d'être exprimée par les cellules immunitaires et les cellules du système nerveux central (SNC), elle est alors impliquée dans les processus immunitaires du SNC en modulant plusieurs phénomènes notamment la production de cytokines et de chimiokines inflammatoires et l'activation des microglies, des macrophages et des astrocytes (Baker et al., 2010).

1.9.3 Rôle SOCS1 dans la fibrose hépatique

La méthylation du SOCS1 peut être un diagnostic de base ou indicateur de risque du carcinohépatocellulaire(CHC). Cette méthylation pourrait également fournir des explications à la différence observée entre les individus dans l'évolution clinique après infection par le virus de l'hépatite (Yoshida et al., 2004). En outre, les tissus de souris déficientes en Socs1 ont présenté une expression accrue des gènes de collagène (Col1a1 et Col3a1) et des niveaux d'hydroxyproline en comparaison avec les souris *Ifn- γ ^{-/-}* et des souris témoins. Les résultats de notre laboratoire sont cohérents avec ceux d'une étude antérieure montrant que la déficience en SOCS1 est associée à des modifications de la fibrose dans le foie (Kandhi et al., 2016).

Les souris déficientes en SOCS1 après une induction chimique de la fibrose hépatique ont montré une augmentation de la fibrose par rapport aux souris témoins, cette augmentation est associée à des dépôts accrus de collagène tel que révélé par la coloration Sirius Red et une teneur élevée en hydroxy proline. Cette observation indique que SOCS1 inhibe la fibrose hépatique indépendamment de l'*Ifn - γ* .

Hypothèse de recherche

La fibrose hépatique est caractérisée par une augmentation de l'expression des différents composants de la MEC qui sont dégradés par des enzymes appelées les MMPs. Ces MMPs sont régulées par l'action d'inhibiteurs endogènes nommés TIMPs. Quand il s'établit un déséquilibre entre les MMPs et les TIMPs, dans un sens il y a évolution, et dans l'autre résolution, de cette fibrose. La protéine SOCS1 est un régulateur capital de la réponse fibrogénique du foie et une partie de cette régulation peut se produire dans les hépatocytes et dans les macrophages. L'expression du SOCS1 dans les hépatocytes et les macrophages joue un rôle important dans la régulation de la fibrose hépatique.

Objectif

L'objectif général de cette étude est d'étudier le rôle protecteur de la protéine SOCS1 dans la fibrose hépatique.

Les objectifs spécifiques sont les suivants:

Objectif #1

Évaluer la réponse fibro-hépatique chez les souris dont les hépatocytes sont déficients en SOCS1.

Objectif #2

Évaluer la réponse fibro-hépatique chez les souris dont les macrophages sont déficients en SOCS1.

ARTICLE 1

Suppressor of Cytokine Signaling 1 expression in hepatocytes and macrophages is critical to control hepatic fibrogenic response

Auteurs de l'article: Euphrasie K.M, Kandhi R, Bobbala D, Khan MGM, Menendez A, Ramanathan S, and Ilangumaran S.

Statut de l'article: soumis

Avant-propos: J'ai réalisé tous les travaux présentés dans ce projet, Kandhi a initié les différents protocoles et Dr. Bobbala et Khan ont participé à l'analyse des données.

Par ailleurs, l'article a été écrit sous la supervision du Dr. Ilangumaran, Dre Ramanathan et Dr. Menendez.

Résumé :

Contexte et objectif: Une lésion persistante du foie peut provoquer une fibrose hépatique (FH), une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire. La compréhension de la pathogénèse moléculaire de la FH pourrait conduire à des nouveaux traitements pour ces maladies. Le suppresseur de la signalisation de cytokine 1 (SOCS1) régule plusieurs cytokines et facteurs de croissance impliqués dans la pathogénèse de la FH. Ici, nous avons étudié la fonction anti-fibrogénique de SOCS1 dans les hépatocytes et les macrophages.

Méthodes: Nous avons généré des souris dépourvues de SOCS1 dans les hépatocytes (*Socs1^{fl/fl} Alb^{Cre}*; *Socs1 Δ Hep*) ou des macrophages (*Socs1^{fl/fl} LysM^{Cre}*; *Socs1 Δ M ϕ*) et nous avons évalué la réponse fibro-hépatique au tétrachlorure de carbone (CCl₄). Les lésions hépatiques et la fibrose ont été évaluées par les taux sériques d'Alanine transaminase (ALT) définir, l'histopathologie et le taux d'hydroxyproline dans le foie. Les changements dans

l'expression des enzymes de la matrice extracellulaire et du remodelage, des cytokines et des chimiokines ont été évalués par qRT-PCR.

Résultats: Les souris *Socs1^{fl/fl} Alb^{Cre}* et *Socs1^{fl/fl} LysM^{Cre}* présentaient une FH sévère caractérisée par une augmentation du dépôt de collagène, de la teneur en hydroxyproline, de l'accumulation de myofibroblastes et de l'expression des gènes *Acta2* et *Coal1*. Le traitement par CCl4 a causé des dommages significatifs aux hépatocytes chez les souris *Socs1^{fl/fl} Alb^{Cre}* mais pas chez les souris *Socs1^{fl/fl} LysM^{Cre}*. Les deux souris ont montré une expression réduite de *Mmp2* et une augmentation de l'expression de *Timp1*. L'induction de *Il6*, *Tnfa* et *Tgfb* n'était pas significativement altérée par une déficience en SOCS1 dans les hépatocytes ou dans les macrophages, ce qui diminuait l'INF γ et augmentait l'expression de *Pdgfb*. Les foies *Socs1^{fl/fl} Alb^{Cre}* et *Socs1^{fl/fl} LysM^{Cre}* présentaient une augmentation de l'infiltration des cellules mononucléaires associée à une expression élevée de *Ccl2*, tandis que les foies *Socs1^{fl/fl} LysM^{Cre}* présentaient également une expression accrue de *Cx3cr1*.

Conclusions: SOCS1 est un régulateur important de la FH. Il exerce ses fonctions anti-fibrotiques dans les hépatocytes et les macrophages. Alors que le SOCS1 dans les hépatocytes atténue la mort cellulaire chez les hépatocytes, dans les cellules myéloïdes, il contrôle la cascade inflammatoire conduisant à la FH.

Mots clés : Fibrose hépatique, cytokines, SOCS1, hépatocyte, macrophage

Lay summary

Chronic injury to the liver causes tissue scarring or liver fibrosis. When deregulated, liver fibrosis can evolve into cirrhosis, compromise liver functions and promote liver cancer development. Understanding the cellular and molecular pathways of deregulated liver fibrosis could lead to better treatment for these deadly liver diseases. This study shows that a protein called SOCS1 plays a crucial regulatory role in two important cell types in the liver, namely hepatocytes and macrophages, to control liver fibrosis.

Background

Hepatocytes are constantly exposed to potentially toxic substances brought to the liver from the gut via the portal circulation. Even though most of the toxic substances are detoxified by hepatocytes, they sustain injury to varying extent in that process. Damage to hepatocytes cause cellular stress and even death that release inflammatory mediators to initiate an inflammatory response^{1,2}. Besides hepatitis viruses, many other pathogens entering the liver via portal and systemic circulation can set off an inflammatory response³. Such inflammatory reactions are often associated with tissue fibrosis, which aids the repair and regenerative process^{4,5}. However, recurrent exposure to hepatotoxic substances such as alcohol abuse, and persistent infections by hepatitis viruses cause chronic inflammation that results in extensive liver fibrosis (LF) and eventually lead to cirrhosis. Whereas the normal fibrotic response is protective and resolves upon elimination of the causative agents, cirrhosis is irreversible, obliterates the liver parenchyma, compromises vital liver functions and promotes the development of hepatocellular carcinoma (HCC)^{6,7}. Indeed, more than 90% of hepatocellular carcinoma arises in cirrhotic livers. Even without accompanying HCC, cirrhosis is an important cause of global morbidity and mortality⁸. In recent years, non-alcoholic fatty liver disease arising from the obesity epidemic is emerging as an important cause of chronic liver inflammation, fibrosis and HCC⁹⁻¹¹. Hence, understanding the cellular and molecular mechanisms of hepatic fibrogenic response holds promise to identify new targets of therapeutic intervention to hasten fibrosis resolution and prevent HCC¹².

The hepatic fibrogenic response is initiated upon activation of tissue resident macrophages that recognize danger-associated molecules released by dying hepatocytes and pathogen-derived molecules^{2,13}. Cytokines and growth factors produced by the activated

macrophages, as well as the inflammatory molecules released by damaged hepatocytes stimulate hepatic stellate cells (HSC) to transdifferentiate into myofibroblasts, which proliferate and produce abundant quantities of abnormal collagen fibrils and other extracellular matrix (ECM) proteins ¹⁴. Accompanying changes in the expression of ECM modifying enzymes promotes the accumulation of ECM, the distinguishing feature of tissue fibrosis. While fibrosis resolution restores the normal ECM, chronic liver injury deregulates this process and replaces hepatocytes with fibrous scar tissue. During the hepatic fibrogenic response, cytokines and growth factors also influence hepatocyte survival and regeneration and modulate macrophage functions ^{15,16}. Regulation of these cytokines and growth factors is critical to achieve a controlled fibrogenic response and its eventual resolution, whereas their deregulated synthesis or uncontrolled activity often accompanies pathologic LF. Animal models have been instrumental in understanding the contributions of various cytokines and growth factors, and their regulatory mechanisms in the hepatic fibrogenic response ^{17,18}.

An important regulatory mechanism controlling cytokine and growth factor stimulation of hepatocytes, macrophages, HSCs and other immune cells in the liver involves the suppressor of cytokine signaling family protein SOCS1 ¹⁹. Loss of hepatic SOCS1 expression due to epigenetic suppression in human patients with chronic liver disease is associated with increased fibrosis and mice lacking one allele of the *Sox1* gene were more susceptible than control mice to experimental fibrosis induction ²⁰. This study used *Sox1*^{+/-} mice due to perinatal lethality of SOCS1-null mice due to uncontrolled IFN γ signaling ²¹. As IFN γ exerts an anti-fibrogenic effect, we have used *Sox1*^{-/-}*Ifng*^{-/-} mice to demonstrate the IFN γ -independent anti-fibrogenic role of SOCS1 in the liver ²². However, it remains to be established whether SOCS1 exerts its functions in hepatocytes, macrophages or HSCs, the

most predominant cell types implicated in LF. In this study, we have partially addressed this question using mice lacking SOCS1 in hepatocytes or macrophages.

Methods

Mice

Generation of *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* mice lacking SOCS1 expression in hepatocytes has been previously reported²³. Mice expressing the Cre recombinase under the hepatocyte-specific albumin promoter (*Alb^{Cre}*) or under the lysozyme promoter (*LysM^{Cre}*) that is highly expressed in macrophages and other myeloid cells²⁴ purchased from the Jackson labs (Bar Harbor, ME, USA) was crossed with *Socs1^{fl/fl}* mice to generate *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice lacking SOCS1 expression in macrophages. All experimental protocols on animals were carried out in accordance with the guidelines of the Université de Sherbrooke Animal Ethics Committee (Protocol number 359-14B).

Induction of liver fibrosis and serum ALT measurement

Carbon tetrachloride (CCl₄; Sigma-Aldrich, Oakville, ON) diluted in corn oil as vehicle at 1:2 ratio was used to induce LF as described previously²². Briefly, CCl₄ was administered via intra-peritoneal route (0.5 µl/g body weight) in 8-10-week-old male mice every 2-3 days for five weeks. Three or four days after the last CCl₄ administration, mice were euthanized, and serum and liver tissues were collected and preserved at -80°C until use. For histopathology examination, liver tissues were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin blocks. Serum alanine transferase (ALT) levels were measured using a kinetic assay kit from Pointe Scientific Inc. (Brussels, Belgium).

Histopathology

Sections of formalin-fixed paraffin embedded liver tissues 5 μ M in thickness were deparaffinized, rehydrated, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) or Sirius red as previously described ²². For immunohistochemical staining of alpha smooth muscle actin (α SMA), the antigenic epitopes were retrieved by intermittent microwave treatment for 10 min in citrate buffer (pH 6.0). Following 10 min incubation in 3% hydrogen peroxide to eliminate endogenous peroxidase activity, the sections were blocked with 5% BSA in Tris-buffered saline containing 20% Tween-20 (TBS-T). The slides were incubated overnight at 4°C with anti-SMA mouse Ab (Abcam, #7817) followed by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary Ab for 1h before applying the chromogenic substrate 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich). The sections were counterstained with hematoxylin, mounted and digital images were acquired using a Nanozoomer Digital Pathology (NDP) Slide Scanner (Hamamatsu Photonics, Japan). The images were analyzed by the NDP software to select 20 random fields from 4 mice in each group to quantify sirius red staining and SMA-positive areas using the NIH Image J software.

Hydroxyproline assay

Hydroxyproline content of the liver tissues was measured as described previously ²². Briefly, about 10 mg of tissue was homogenized in 1ml of 6N HCl using the bead mill MM 400 (Retsch, Hann, Germany). The lysate was transferred to screw-capped glass tubes, topped up with 2 ml of 6N HCl, and proteins were hydrolyzed by boiling the contents at 110°C for 16 hours on a heat block inside a fume hood. Aliquots of the hydrolysate, filtered through Whatman #1 filter paper, were evaporated in glass tubes and the sediment was dissolved in 50% 2-propanol. Test samples and hydroxyproline standards were distributed into a 96-well

microtiter plate and oxidized by the addition of chloramine T reagent (Sigma-Aldrich) dissolved in 50% isopropanol and adjusted to pH 6.5 with acetate/citrate buffer. Following 25 min incubation at room temperature, *p*-dimethylaminobenzaldehyde dissolved in n-propanol/perchloric acid (2:1) (Ehrlich reagent) was added and the samples were incubated at 50°C for 10 min to allow color development. Absorbance was read at 550 nm using a spectrophotometer and hydroxyproline content was expressed as µg/g liver tissue.

Gene expression analysis

RNA was extracted from frozen liver tissues using RiboZol™ (AMRESCO, Solon, OH) and RNA purity and RNA quality was tested by UV absorption and denaturing formaldehyde-agarose gel electrophoresis, respectively. cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using the QuantiTect® reverse transcription Kit (Qiagen). Gene expression was evaluated by quantitative RT-PCR using the MyQi5® cycler (Bio-Rad, Mississauga, ON) using the primers listed in Table 1. All primers showed 90-100% efficiency and displayed a single melting curve. Expression levels of specific genes were normalized for the housekeeping gene *m36B4* within each experimental group and expressed as fold induction compared to *Socs1^{fl/fl}* littermate controls treated with the vehicle.

Statistical Analysis

GraphPad Prism software (San Diego, CA) was used for data analysis and to calculate statistical significance by ANOVA or Mann-Whitney test. *p* values <0.05 were considered significant.

Results

SOCS1 plays an essential role in both hepatocytes and macrophages to control liver fibrosis

Damage to hepatocytes is often the initiating event during sterile inflammation of the liver, and macrophages play a key role in conveying this message to HSCs to mount the hepatic fibrogenic response in order to contain the damage. As total SOCS1 deficiency promotes liver fibrosis, we tested whether the anti-fibrogenic activity of SOCS1 is exerted on hepatocytes, macrophages or both using mice lacking SOCS1 in hepatocytes or in macrophages. Following five weeks of CCl₄ treatment, liver sections from *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* mice showed extensive, bridging fibrosis as revealed by sirius red staining of collagen fibrils compared to control mice (Fig. 1a-d). Quantification of the sirius red staining areas showed that *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* livers showed four times more fibrotic areas than control livers (Fig. 1i). This was further supported by significantly elevated hydroxylproline content in SOCS1-deficient livers (Fig. 1k).

Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre} mice lacking SOCS1 in macrophages showed a similar increase in susceptibility to LF as revealed by increased sirius red staining with extensive bridging pattern and high hepatic hydroxylproline content compared to littermate controls (Fig. 1 e-h, j, l). Notably, *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice treated with the vehicle (corn oil) showed significantly higher level of LF than control mice (Fig. 1, l, columns 1 and 2). However, evaluation of hepatocyte damage by serum alanine transaminase levels at the end of the CCl₄ treatment regimen was not significantly altered in *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice whereas *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* livers showed elevated ALT levels (Fig. 1, m, n). These findings indicated that SOCS1 plays a

crucial role in hepatocytes and in macrophages to control LF induced by hepatotoxic agents, although SOCS1 deficiency in hepatocytes also increased their susceptibility to death.

Loss of SOCS1 in hepatocytes or macrophages promotes myofibroblast activation

Hepatic fibrogenic response is associated with trans-differentiation of HSC to myofibroblasts, which synthesize and deposit the extracellular matrix proteins that characterize the fibrotic tissue. Therefore, we evaluated the liver myofibroblast content in mice lacking SOCS1 in hepatocytes or macrophages by immunohistochemical staining for α SMA. Both *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* and *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice treated with CCl₄ showed more abundant α SMA staining in the liver than vehicle-treated mice (Fig. 2a-d, 2e-h). The α SMA-staining pattern closely overlapped with the sirius red-stained fibrotic areas shown in Fig. 1a-d and 1e-h. Quantification of α SMA staining showed significantly higher myofibroblast content in livers lacking SOCS1 either in hepatocytes or macrophages than in control livers following CCl₄ treatment (Fig. 2 i, j; columns 3 and 4). Even though vehicle-treated SOCS1 deficient mice showed increased α SMA-staining area (Fig. 2i, j; columns 1 and 2), such difference was not visually apparent in the stained sections (Fig. 2c, g). As the quantification of SMA staining could be influenced by variations in staining intensities, we evaluated the myofibroblast content by qRT-PCR evaluation of *Acta2*, which codes for α SMA. Mice deficient for SOCS1 in hepatocytes or macrophages showed significantly elevated *Acta2* expression following CCl₄ treatment compared to control mice (Fig. 2 k, l; columns 3 and 4). Moreover, the *Acta2* expression closely correlated with that of *Colla1*, the gene coding for collagen type 1 α 1 chain (Fig. 2 m, n). Unlike the α SMA-staining area, neither *Acta2* nor *Colla1* showed increased expression in vehicle-treated *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* mice compared to controls (Fig. 2 k, m). However, vehicle-treated *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* showed a small but significant increase in

Acta2 though not *Coll1a1* expression (Fig. 2l, n). These findings confirm the increased susceptibility of both *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* and *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice to strong fibrogenic stimuli and suggest that loss of SOCS1 in macrophages may render the liver susceptible to even mild fibrogenic assaults.

SOCS1 deficiency in hepatocytes or macrophages alters the expression of ECM modifying enzymes in the liver

Matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of MMPs (TIMP) are differentially expressed during hepatic fibrogenic response to favor net ECM deposition²⁵. Therefore, we examined whether the increased accumulation of ECM in the livers of mice lacking SOCS1 in hepatocytes or macrophages is associated with altered expression of MMPs and TIMPs. Loss of SOCS1 in either hepatocytes or macrophages reduced the induction of *Mmp2* by CCl₄ in the liver (Fig. 3a, b; columns 3 and 4). On the other hand, the expression of *Mmp9* and *Mmp14* showed substantial differences in the various groups of mice. Interestingly, hepatocyte- and macrophage-specific loss of SOCS1 resulted in the induction of *Mmp9* and *Mmp14* by the vehicle (c, d; e, f; columns 1 and 2). CCl₄ treatment further augmented *Mmp9* induction in *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* mice but not in *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice (Fig. 3c, d; columns 2 and 4). However, *Mmp14* induced by corn oil in *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* and *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice was not further modulated by CCl₄ (Fig. 3e, f; columns 2 and 4). Notably, CCl₄-induced expression of *Timp1* was augmented more than four-fold by the loss of SOCS1 in either hepatocytes or macrophages (Fig. 3g, h; columns 3 and 4).

Expression of inflammatory and fibrogenic cytokines in the livers lacking SOCS1 in hepatocytes or macrophages

Next we examined the induction of candidate pro-fibrogenic and antifibrogenic cytokine genes in the liver tissues of SOCS1 deficient and control mice. CCl₄ induced the expression of *Il6* in control groups of mice, but this was not further modulated by SOCS1 deficiency either in hepatocytes or macrophages (Fig. 4a, b; columns 3 and 4). Notably, the SOCS1-deficient livers showed significantly elevated expression of *Il6* in response to corn oil treatment (Fig. 4a, b; columns 1 and 2) that appears to blunt the CCl₄-mediated *Il6* gene induction. Induction of *Tnfa* gene also showed similar pattern (Fig. 4c, d), although the magnitude of response of markedly diminished in *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice compared to *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* mice. The pro-fibrogenic cytokine gene *Tgfb* was significantly induced in CCl₄-treated control mice (Fig. 4e, f; columns 1 and 3), whereas SOCS1-deficient mice, which showed discernible increase in the expression of *Tgfb* in response to vehicle (Fig. 4e, f; columns 1 and 2), did not show significant upregulation following CCl₄ treatment (Fig. 4e, f; columns 2 and 4). However, both *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* and *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice showed significant increase in the expression of *Pdgfb* following CCl₄ treatment that was not observed with the vehicle treatment (Fig. 4g, h).

IFN γ exerts an anti-fibrogenic role in liver fibrosis. Evaluation of *Ifng* gene expression showed discernible, though not significant, increase in CCl₄-treated control groups whereas liver tissues from mice lacking SOCS1 in hepatocytes or macrophages failed to upregulate *Ifng* following CCl₄ treatment (Fig. 4i, j).

Increased leukocyte infiltration and altered chemokine expression and in the livers lacking SOCS1 in hepatocytes or macrophages

The hematoxylin and eosin stained sections of the livers showed increased mononuclear infiltration in the livers of mice lacking SOCS1 in hepatocytes or macrophages following CCl₄ treatment (Fig. 5b, d, g, h). Notably *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice livers showed marked increase in leukocyte infiltration even after treatment with the vehicle (Fig. 5a, c, e, f), that corroborated with increased fibrosis in these mice exposed to corn oil (Fig. 1e, g, j, l). As infiltration of immune cells during liver fibrosis and its resolution is mainly driven by chemokines²⁶, we examined the expression of key pro-inflammatory and pro-fibrogenic cytokines *Ccl2* and *Ccl5*, and *Cx3cr1* receptor for the anti-fibrogenic chemokine CX3CL1. Notably, corn oil alone induced *Ccl2* and *Ccl5* in both *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* and *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice (Fig. 5i, j, k, l). CCl₄ caused a moderate induction of *Ccl2* in control mice that was dramatically increased in the absence of SOCS1 in hepatocytes or macrophages (Fig. 5i, j). However, CCl₄-induced *Ccl5* expression was decreased in *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* mice but remained unchanged *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice (Fig. 5k, l). On the other hand, the induction of *Cx3cr1* showed an opposite trend with no change in *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* mice but markedly increased in *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice (Fig. 5m, n). These results suggest that SOCS1 deficiency either in hepatocytes or in macrophages promotes liver fibrosis by modulating the immune cell infiltration and potentiation of the hepatic fibrogenic response.

Discussion

We have previously shown that SOCS1-deficient mice are highly susceptible to liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine or CCl₄, and to experimental hepatocarcinogenesis elicited by diethylnitrosamine (DEN)^{22,23}. Investigations into the anti-tumor mechanisms of SOCS1

revealed that SOCS1 deficiency in hepatocytes renders them less susceptible to death following acute exposure to DEN²³. As hepatocyte damage is the key initiator of hepatic fibrogenic response¹, we postulated that SOCS1 is unlikely to mediate its anti-fibrogenic functions in hepatocytes. On the other hand, SOCS1 deficient macrophages are highly sensitive to innate immune stimuli^{27,28}. Hence, we hypothesized that SOCS1 may be critical to control macrophage responses during hepatic fibrogenic response. To test these hypotheses, we generated mice lacking SOCS1 either in hepatocytes or in macrophages and evaluated their hepatic fibrogenic response to CCl₄. Our findings show that loss of SOCS1 in either hepatocytes or macrophages potentiates the hepatic fibrogenic response, accompanied by very similar molecular and cellular changes albeit with a few notable differences.

Hepatocyte injury and the ensuing apoptosis or necrosis releases cellular contents that are taken up by Kupffer cells and HSCs that initiate the fibrogenic response through the release of inflammatory and fibrogenic cytokines and production of extracellular matrix in an effort to contain the injury¹. SOCS1 deficiency in hepatocytes results in elevated ALT levels at the end of the CCl₄-treatment regimen, which suggests increased hepatocyte damage and consequent augmentation of liver fibrosis. In contrast to the elevated ALT following chronic liver injury for 5 weeks in *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* mice, we have previously shown that in these mice acute hepatocyte damage induced by a single administration of DEN resulted in reduced ALT levels after 48 hours²³. This apparent difference in ALT levels following acute versus chronic hepatocyte injury in *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* mice could arise from the possibility that chronic hepatocyte damage might overcome the anti-apoptotic mechanisms mediated by aberrant cytosolic localization of CDKN1A. Given the role of SOCS1 in

regulating the functions of p53 and the regulation of hepatocyte survival by p53^{29,30}, it is also possible that SOCS1-deficient hepatocytes may suffer more severe damage and liberate abundant quantities of pro-fibrogenic mediators than normal hepatocytes. Further investigations are needed to understand the how SOCS1 protects hepatocyte damage during chronic liver injury.

The increased hepatic fibrogenic response observed in *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice is consistent with the critical role of SOCS1 in regulating macrophage activation by innate immune stimuli and with the key pathogenic role of macrophages in liver fibrosis^{27,28}. Importantly, loss of SOCS1 in macrophages increased the susceptibility to liver fibrosis induction by less severe assaults such as corn oil used as vehicle to administer CCl₄. As the *LysM* promoter is expressed also in other myeloid cells and is constitutively active in polymorphonuclear neutrophils (PMN)²⁴, it is possible that SOCS1-deficient neutrophils could also contribute to the heightened fibrogenic response observed in *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice. Neutrophils are rapidly recruited to the liver during sterile inflammation as well as during infections, and contribute to hepatocyte injury through release of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines³¹. In a recent study, Gao and colleagues have shown that neutrophils play a key role on high-fat diet- and ethanol- induced steatohepatitis and liver fibrosis³². In this model, GM-CSF and IL-15 secreted from activated HSC promote neutrophil survival and their inflammatory response. It is noteworthy that SOCS1 is a regulator of IL-15 signaling in lymphocytes and IL-15 promotes neutrophil survival by upregulating the anti-apoptotic protein MCL1^{33,34}. Earlier studies have used *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice in the context of inflammation and infection, and some have showed increased neutrophil accumulation³⁵⁻³⁷. Even though increased neutrophil accumulation could occur in

the inflamed tissues of *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice as a sequel to deregulated macrophage responses, it remains to be tested whether SOCS1 deficiency in neutrophils also increases their survival and activation in response to IL-15 and GM-CSF, contributing to the heightened inflammatory response and tissue fibrosis.

Inflammatory cytokines promote LF by perpetuating the inflammatory cascade and by inducing the key fibrogenic cytokine TGF β , whereas growth factors such as PDGF promote HSC proliferation³⁸. CCl₄ treatment increased the expression of *Il6*, *Tnfa* and *Tgfb* genes in control mice, whereas *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* and *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice showed increased levels of these gene transcripts even with vehicle treatment, suggesting the critical requirement of SOCS1 in reducing inflammation to maintain tissue homeostasis. However, even though SOCS1 deficiency did not upregulate these cytokines further than that was observed in CCl₄-treated control mice, both *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* and *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice showed marked increase in *Pdgfb* expression following CCl₄ treatment compared to control mice. PDGF β promotes liver fibrosis by inducing proliferation and activation of HSCs^{39,40}. As PDGF β expression predominantly occurs in inflammatory macrophages of fibrotic livers⁴⁰, it is likely that the increased inflammatory response that occur in *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* and *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* liver augments *Pdgfb* expression in macrophages contributing to more abundant myofibroblasts and matrix deposition. Moreover, HSC in these mice may also escape other regulatory mechanisms. First, TIMP1, which promotes liver fibrosis not only by inhibiting MMPs but also by promoting HSC survival^{41,42}, is highly induced in the livers of CCl₄-treated *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* and *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice. Second, these livers also displayed downmodulation of *Ifng*, which was discernibly increased in control mice. IFN γ attenuates liver fibrosis by inhibiting proliferation of HSC and their collagen production, as well as by

augmenting NK-mediated killing of activated HSC⁴³⁻⁴⁷. Hence, reduced *Ifng* induction in SOCS1 deficient livers may allow HSC escape NK cell-mediated killing. Collectively, several mechanisms could contribute to the increased HSC accumulation and their transdifferentiation in *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* and *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice.

Altered expression of chemokines and chemokine receptors play a key role in the pathogenesis and resolution of liver fibrosis²⁶. Notable pro-fibrogenic chemokines are CCL2 and CCL5, which also exert pro-inflammatory functions. CCL2, produced mainly by hepatocytes, Kupffer cells and HSCs, not only induces infiltration of monocytes but also promotes migration and activation of HSCs during fibrogenesis^{48,49}. Even though HSCs are the main source of CCL5, it could also come from hepatocytes, leukocytes and platelets. CCL5 acts on HSCs in autocrine and paracrine manner to facilitate migration, proliferation and activation of HSCs^{50,51}. The increased *Ccl2* and *Ccl5* expression in vehicle-treated *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* mice could arise from SOCS1 deficient hepatocytes, although it remains to be confirmed using isolated SOCS1 deficient hepatocytes. However, similar increase of *Ccl2* and *Ccl5* expression in vehicle-treated *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice indicate that activated HSCs at the effector phase of the fibrogenic cascade could be a major source of these pro-inflammatory, pro-fibrogenic chemokines. Notably, the livers of CCl₄-treated *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* mice showed increased expression of Cx3cr1, which is predominantly expressed in monocytes and monocyte-derived macrophages and exerts anti-fibrogenic functions^{26,52}. Whether SOCS1 deficiency simply tilts the balance towards profibrogenic inflammation, or also overcomes the antifibrotic functions of CX3CR1, remains to be addressed.

Conclusions

SOCS1 plays a non-redundant role in hepatocytes and macrophages to regulate the hepatic fibrogenic response. Whereas SOCS1 expression in hepatocytes may serve to limit cellular damage and the release of pro-inflammatory mediators that initiate the fibrogenic response during persistent liver injury, SOCS1 in macrophages may serve to regulate the perpetuation and amplification of the inflammatory responses. SOCS1 controls ECM deposition by regulating the expression of ECM modulating enzymes MMP2 and TIMP1, and the pro-fibrogenic growth factor PDGF β and chemokines CCL2 and CCL5. Further studies are needed to decipher the mechanisms by which SOCS1 regulates the various molecular players of liver fibrosis in different cellular compartments.

References

1. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1655-1669.
2. Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol*. 2015;62(1 Suppl):S15-24.
3. Talwani R, Gilliam BL, Howell C. Infectious diseases and the liver. *Clin Liver Dis*. 2011;15(1):111-130.
4. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008;214(2):199-210.
5. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):181-194.
6. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(9):674-687.
7. Zhang DY, Friedman SL. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2012;56(2):769-775.
8. Mokdad AA, Lopez AD, Shahrz S, et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Med*. 2014;12:145.
9. Chiang DJ, Pritchard MT, Nagy LE. Obesity, diabetes mellitus, and liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300(5):G697-702.
10. Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J Hepatol*. 2012;56(3):704-713.

11. Karagozian R, Derdak Z, Baffy G. Obesity-associated mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Metabolism*. 2014;63(5):607-617.
12. Rockey DC. Translating an understanding of the pathogenesis of hepatic fibrosis to novel therapies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(3):224-231 e221-225.
13. Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol*. 2014;60(5):1090-1096.
14. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(7):397-411.
15. Moreno M, Bataller R. Cytokines and renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis*. 2008;12(4):825-852, ix.
16. Kong X, Horiguchi N, Mori M, Gao B. Cytokines and STATs in Liver Fibrosis. *Front Physiol*. 2012;3:69.
17. Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2013;6(1):19.
18. Delire B, Starkel P, Leclercq I. Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. *J Clin Transl Hepatol*. 2015;3(1):53-66.
19. Fujimoto M, Naka T. SOCS1, a Negative Regulator of Cytokine Signals and TLR Responses, in Human Liver Diseases. *Gastroenterol Res Pract*. 2010;2010.
20. Yoshida T, Ogata H, Kamio M, et al. SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis. *J Exp Med*. 2004;199(12):1701-1707.
21. Marine JC, Topham DJ, McKay C, et al. SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell*. 1999;98(5):609-616.

22. Kandhi R, Bobbala D, Yeganeh M, Mayhue M, Menendez A, Ilangumaran S. Negative regulation of the hepatic fibrogenic response by suppressor of cytokine signaling 1. *Cytokine*. 2016;82:58-69.
23. Yeganeh M, Gui Y, Kandhi R, et al. Suppressor of cytokine signaling 1-dependent regulation of the expression and oncogenic functions of p21 in the liver. *Oncogene*. 2016;35:4200-4211.
24. Abram CL, Roberge GL, Hu Y, Lowell CA. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *J Immunol Methods*. 2014;408:89-100.
25. Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Dis Model Mech*. 2014;7(2):193-203.
26. Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*. 2014;147(3):577-594 e571.
27. Kinjyo I, Hanada T, Inagaki-Ohara K, et al. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity*. 2002;17(5):583-591.
28. Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity*. 2002;17(5):677-687.
29. Calabrese V, Mallette FA, Deschenes-Simard X, et al. SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Molecular cell*. 2009;36(5):754-767.
30. Weng SY, Yang CY, Li CC, et al. Synergism between p53 and Mcl-1 in protecting from hepatic injury, fibrosis and cancer. *J Hepatol*. 2011;54(4):685-694.
31. Xu R, Huang H, Zhang Z, Wang FS. The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cell Mol Immunol*. 2014;11(3):224-231.

32. Zhou Z, Xu MJ, Cai Y, et al. Neutrophil-Hepatic Stellate Cell Interactions Promote Fibrosis in Experimental Steatohepatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018;5(3):399-413.
33. Ilangumaran S, Ramanathan S, La Rose J, Poussier P, Rottapel R. Suppressor of cytokine signaling 1 regulates IL-15 receptor signaling in CD8⁺CD44^{high} memory T lymphocytes. *J Immunol*. 2003;171(5):2435-2445.
34. Pelletier M, Ratthe C, Girard D. Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2. *FEBS Lett*. 2002;532(1-2):164-170.
35. Hashimoto M, Ayada T, Kinjyo I, et al. Silencing of SOCS1 in macrophages suppresses tumor development by enhancing antitumor inflammation. *Cancer Sci*. 2009;100(4):730-736.
36. Sachithanandan N, Graham KL, Galic S, et al. Macrophage deletion of SOCS1 increases sensitivity to LPS and palmitic acid and results in systemic inflammation and hepatic insulin resistance. *Diabetes*. 2011;60(8):2023-2031.
37. Pinos Alvarez AR, Glosson-Byers N, Brandt S, et al. SOCS1 is a negative regulator of metabolic reprogramming during sepsis. *JCI Insight*. 2017;2(13).
38. Borthwick LA, Wynn TA, Fisher AJ. Cytokine mediated tissue fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(7):1049-1060.
39. Kocabayoglu P, Lade A, Lee YA, et al. beta-PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis. *J Hepatol*. 2015;63(1):141-147.

40. Borkham-Kamphorst E, Weiskirchen R. The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;28:53-61.
41. Murphy FR, Issa R, Zhou X, et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem.* 2002;277(13):11069-11076.
42. Thiele ND, Wirth JW, Steins D, et al. TIMP-1 is upregulated, but not essential in hepatic fibrogenesis and carcinogenesis in mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):714.
43. Czaja MJ, Weiner FR, Takahashi S, et al. Gamma-interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology.* 1989;10(5):795-800.
44. Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(20):10663-10668.
45. Shen H, Zhang M, Minuk GY, Gong Y. Different effects of rat interferon alpha, beta and gamma on rat hepatic stellate cell proliferation and activation. *BMC Cell Biol.* 2002;3:9.
46. Jeong WI, Park O, Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology.* 2008;134(1):248-258.
47. Gao B, Radaeva S. Natural killer and natural killer T cells in liver fibrosis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(7):1061-1069.
48. Seki E, de Minicis S, Inokuchi S, et al. CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatology.* 2009;50(1):185-197.

49. Ehling J, Bartneck M, Wei X, et al. CCL2-dependent infiltrating macrophages promote angiogenesis in progressive liver fibrosis. *Gut*. 2014;63(12):1960-1971.
50. Seki E, De Minicis S, Gwak GY, et al. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(7):1858-1870.
51. Berres ML, Koenen RR, Rueland A, et al. Antagonism of the chemokine Ccl5 ameliorates experimental liver fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(11):4129-4140.
52. Karlmark KR, Zimmermann HW, Roderburg C, et al. The fractalkine receptor CX(3)CR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes. *Hepatology*. 2010;52(5):1769-1782.

Figure legends

Figure 1. Mice lacking SOCS1 in hepatocytes or in macrophages show increased liver fibrosis following chemical injury. (a - h) Representative images of Sirius red-stained sections of the livers from control (*Socs1^{fl/fl}*; a, b and e, f), hepatocyte-specific SOCS1-deficient (*Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}*; c, d) and macrophage-specific SOCS1-deficient (*Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}*; g, h) mice, treated with vehicle (corn oil, a, c, e, g) or CCl₄ (b, d, f, h) for five weeks. (i, j) Quantification of the Sirius red-stained areas of collagen deposition. (k, l) Liver hydroxyproline content of the indicated mice. (m, n) Serum transaminase levels in the indicated groups. Quantifications shown (i to n) are mean \pm s.e.m. values from at least 4 and up to 13 mice per group from 2 or 3 independent experiments. Mann-Whitney test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$.

Figure 2. SOCS1 deficiency in hepatocytes or macrophages increases liver myofibroblast content following CCl₄ treatment. (a - h) Immunohistochemical staining of α -smooth muscle actin (α SMA) in liver sections of control mice (a, b and e, f) and mice lacking SOCS1 in hepatocytes (c, d) or macrophages (g, h), treated with vehicle (corn oil, a, c, e, g) or CCl₄ (b, d, f, h). Representative images from 4-6 mice per group from 2 different experiments are shown. Magnified images of the indicated regions are shown below each section. (i, j) Quantification of the SMA-staining areas. (k - n) (C) Quantitative RT-PCR evaluation of *Acta2* (k, l) and *Colla1* (m, n) genes in the livers of vehicle- or CCl₄- treated control and SOCS1 deficient mice. (i to n) Data shown are mean \pm s.e.m. values from at least 4 and up to 14 mice per group from 2 or 3 independent experiments. Mann-Whitney test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$.

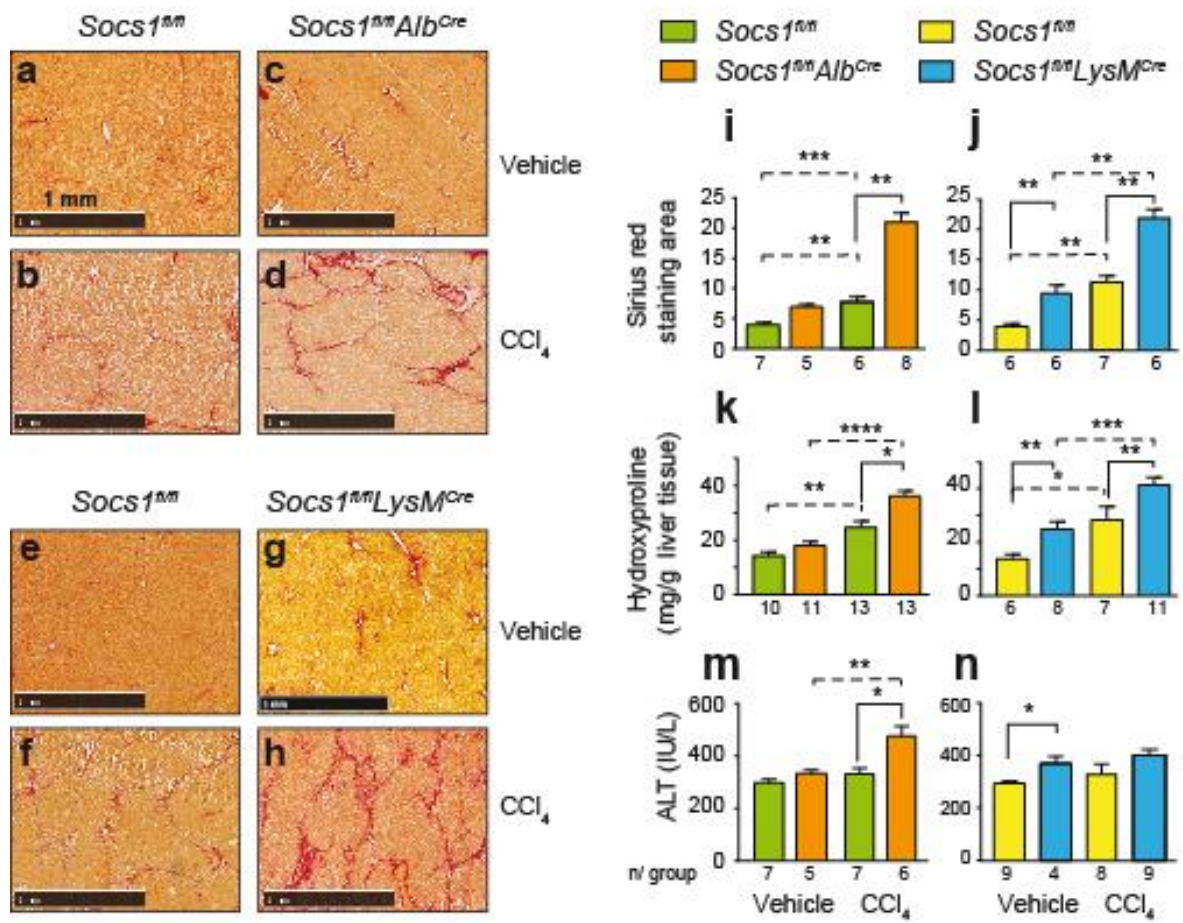
Figure 3. Influence of SOCS1 deficiency in hepatocytes or macrophages on the expression of matrix modulating enzymes during hepatic fibrogenic response. Quantitative RT-PCR evaluation of *Mmp2* (a, b), *Mmp9* (c, d), *Mmp14* (e, f) and *Timp1* (g, h) in the liver tissues of mice lacking SOCS1 in hepatocytes (a, c, e, g) or macrophages (b, d, f, h) and the corresponding littermate controls, treated with CCl₄ or the vehicle corn oil. Data shown are mean ± s.e.m. values from at least 4 and up to 14 mice per group from 2 to 4 independent experiments. Mann-Whitney test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

Figure 4. Effect of hepatocyte or macrophage SOCS1 deficiency on CCl₄-induced inflammatory and fibrogenic cytokine gene expression. Induction of *Il6* (a, b), *Tnfa* (c, d), *Tgfb* (e, f), *Pdgfb* (g, h) and *Ifng* (i, j), genes in the liver tissues of mice lacking SOCS1 in hepatocytes (a, c, e, g, i) or macrophages (b, d, f, h, j) and the corresponding littermate controls, treated with CCl₄ or the vehicle corn oil. Data shown are mean ± s.e.m. values from at least 4 and up to 12 mice per group from 2 to 4 independent experiments. Mann-Whitney test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

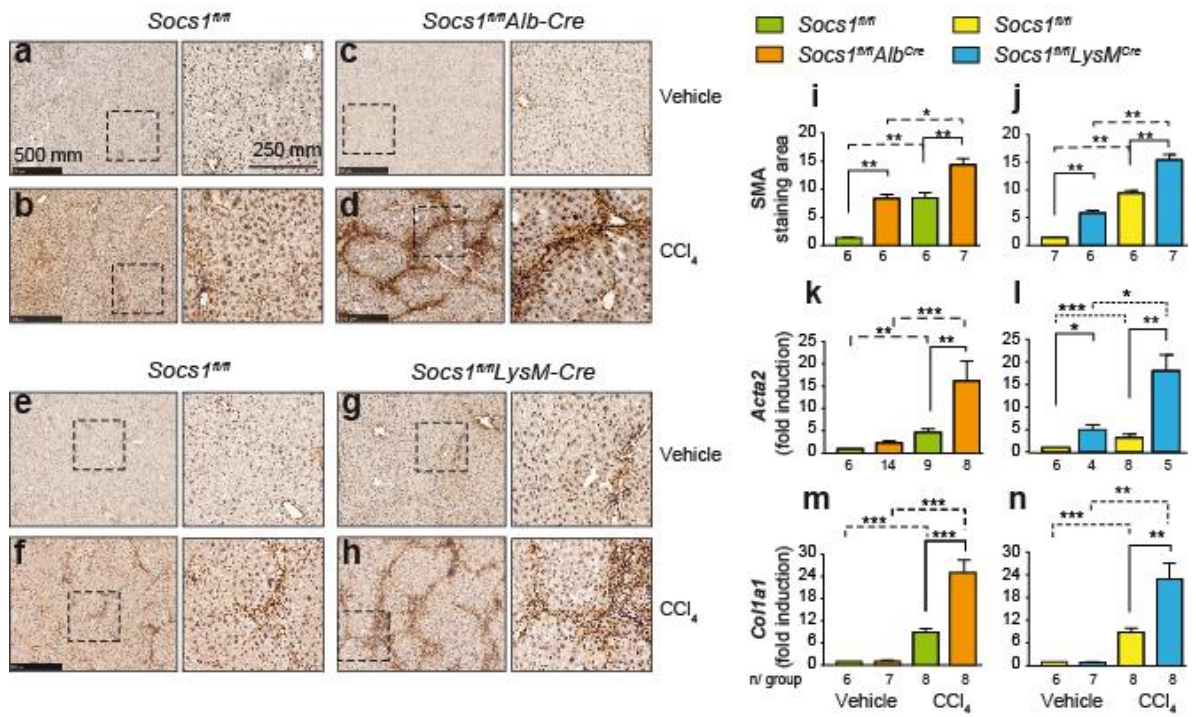
Figure 5. SOCS1 deficiency in hepatocytes or macrophages modulates chemokine expression and promotes mononuclear cell infiltration during liver fibrosis. (a - h) Representative images of haematoxylin and eosin-stained sections of livers from control (*Socs1*^{fl/fl}; a, b and e, g), hepatocyte-specific SOCS1-deficient (c, d) and macrophage-specific SOCS1-deficient (f, h) mice, at the end of treatment regimen with vehicle (corn oil) or CCl₄. Mononuclear cell infiltrations are indicated by arrowheads. (i-n) Expression of *Ccl2* (i, j),

Ccl5 (**k, l**), and *Cx3cr1* (**m, n**) genes in the liver tissues of mice lacking SOCS1 in hepatocytes (**i, k, m**) or macrophages (**j, l, n**) and the corresponding littermate controls, treated with CCl₄ or the vehicle corn oil. Data shown are mean \pm s.e.m. values from at least 4 and up to 10 mice per group from 2 to 3 independent experiments. Mann-Whitney test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

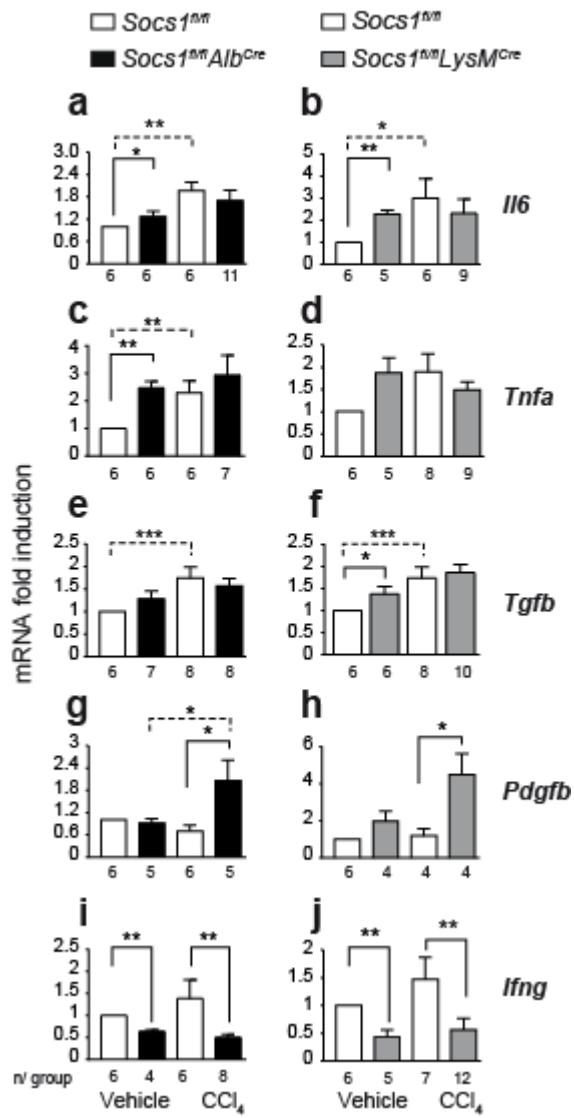
Mafanda et al.,
Fig. 1



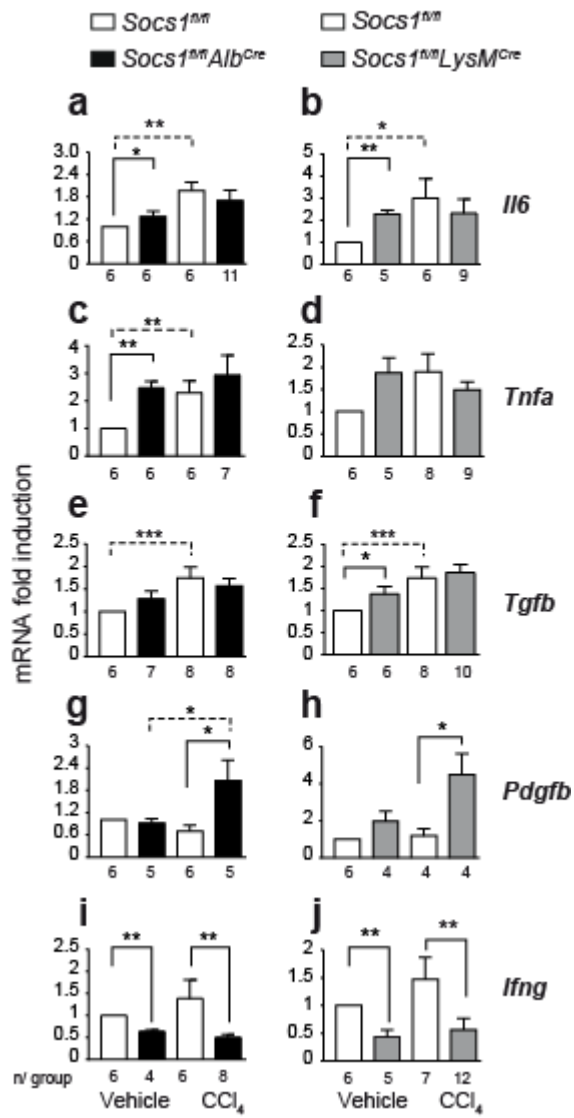
Mafanda et al.,
Fig. 2



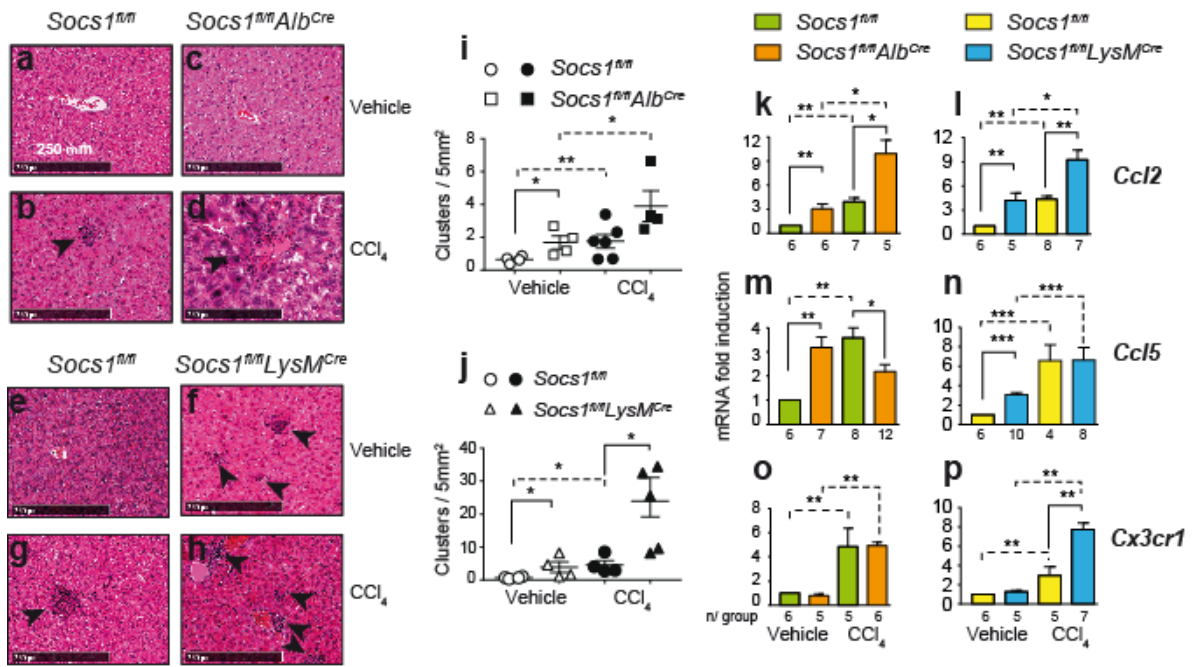
Mafanda et al.,
Fig. 4



Mafanda et al.,
Fig. 4



Mafanda et al.,
Fig. 5



4.DISCUSSION

La fibrose hépatique survient généralement après une lésion chronique que subit le foie. Cette lésion se traduit par l'activation des cellules stellaires hépatiques, la libération de médiateurs inflammatoires et l'implication des cellules de Kupffer et des lymphocytes. La libération des cytokines et des facteurs de croissance au cours de cette réponse inflammatoire affecte la pathogenèse de la fibrose hépatique de manière très complexe et interconnectée. Des souris transgéniques accusant la déficience des gènes spécifiques ont apporté une lumière dans les études récentes sur les voies de signalisation et les mécanismes qui contrôlent la fibrose hépatique. SOCS1, qui est l'un des régulateurs négatifs de rétroaction importante de nombreuses cytokines et facteurs de croissance, est aussi impliqué dans la réponse fibrogénique du foie. En utilisant deux modèles murins de fibrose hépatique induite chimiquement par le tétrachlorure de Carbone (CCl₄), nos résultats montrent que la déficience du SOCS1 dans les hépatocytes ou dans les macrophages potentialise la réponse fibro-hépatique et cette réponse s'accompagne des modifications cellulaires ainsi que moléculaires qui sont semblables dans les deux modèles mais avec quelques différences qui les distinguent.

La contribution de SOCS1 dans la fibrose hépatique a été établie dans plusieurs modèles expérimentaux (Yoshida et al., 2004) ainsi que dans notre laboratoire. Les études précédentes ont démontré que les souris déficientes en SOCS1 sont sensibles à la fibrose hépatique induite par le diméthylnitrosamine (DEN) ou par le CCl₄, et aussi sensible à l'hépatocarcinogénèse expérimentale induite par le DEN (Kandhi et al., 2016). Le gène qui code SOCS1 est souvent réprimé dans le carcinome hépatocellulaire (CHC), ce qui amène à confirmer que, SOCS1 est considéré comme un suppresseur de tumeur dans le foie. (Yeganeh et al., 2016). Les études évoquant la méthylation du gène SOCS1 montrent que cette méthylation chez les patients atteints de maladies chroniques du foie corrèle avec la sévérité de la maladie. Des observations similaires ont été faites chez un modèle murin où la fibrose est induite par le DEN (Kandhi et al., 2016). Ces résultats indiquent un rôle protecteur de la protéine SOCS1 dans les lésions chroniques du foie ainsi que dans la fibrose hépatique suggérant aussi une protection contre l'hépatocarcinogénèse. Après une étude du rôle

protecteur de SOCS1 chez les souris déficientes en SOCS1 et *Ifng* de façon non ciblée, il s'est avéré important de mener une autre étude chez les souris déficientes en SOCS1 seulement dans les hépatocytes, dans les CSH ou dans les macrophages; cellules jouant un rôle important dans la survenue des maladies chroniques du foie et dans la fibrose hépatique.

Les lésions hépatiques et l'apoptose sont évaluées chez les souris déficientes en SOCS1 au niveau des hépatocytes, après une induction de la FH par le CCl₄. La détermination du taux de l'alanine transaminase (ALT) est un indicateur qui permet d'évaluer le degré de dommages subit par le foie. En effet, ALT est une enzyme localisée dans les hépatocytes et, en cas de lésions, cette enzyme est déversée dans le sang périphérique. Ces lésions entraînent des taux élevés d'ALT à la fin du traitement par CCl₄, suggérant ainsi une augmentation des lésions hépatocytaires qui se traduit par une augmentation consécutive de la fibrose hépatique. Ces résultats sont différents avec ceux obtenus chez les souris déficientes en SOCS1, dont les lésions hépatocytaires aiguës ont été induites par une seule injection de DEN ce qui module à la baisse le taux d'ALT après 48 heures. Ainsi, l'augmentation des taux d'ALT à la suite d'une lésion aiguë ou chronique des hépatocytes chez les souris *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* indiquerait la possibilité que les dommages hépatocytaires chroniques pourraient surmonter les mécanismes anti-apoptotiques médiés par la localisation cytosolique aberrante de CDKN1A. Étant donné le rôle de SOCS1 dans la régulation des fonctions de p53 et la régulation de la survie des hépatocytes par p53 (Weng et al. 2011)(Calabrese et al. 2009), il est également possible que les hépatocytes déficients en SOCS1 soient plus sévèrement endommagés et libèrent des quantités abondantes de médiateurs pro-fibrogéniques que les hépatocytes normaux. D'autres investigations s'avèrent nécessaires pour comprendre comment le SOCS1 protège contre les dommages causés aux hépatocytes au cours d'une lésion hépatique chronique.

Les résultats montrent que la réponse fibro-hépatique accrue observée chez les souris *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* est cohérente avec le rôle prépondérant de SOCS1 dans la régulation et dans l'activation des macrophages par des stimuli immunitaires. Ils montrent également le rôle clé joué par les macrophages dans la fibrose hépatique (Kinjyo I et al.2002; Nakagawa R et al.2002). Le fait culminant de la perte de SOCS1 dans les macrophages est l'augmentation

de la susceptibilité à l'induction de la fibrose hépatique par des agressions non toxiques comme l'huile de maïs utilisée comme véhicule pour l'administration du CCl₄. Comme le promoteur *LysM* est également exprimé dans d'autres cellules myéloïdes et est constitutivement actif dans les neutrophiles (Abram Cl et al., 2014), il est possible que les neutrophiles déficients en SOCS1 contribuent également à la réponse fibrogénique accrue observée chez les souris *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}*.

A la lumière des résultats obtenus dans les recherches précédentes par le groupe montrant la déposition du collagène dans les tissus fibrotiques, nous avons récolté les tissus de foie après sacrifice de nos souris et nous avons examiné la structure du parenchyme hépatique et l'infiltration des cellules mononuclées par coloration à l'hématoxyline-éosine. Les modifications observées dans la structure du parenchyme accompagnées des infiltrations suggèrent qu'à la suite du traitement au CCl₄, les cellules stellaires hépatiques activées produisent des chimiokines qui attirent plus de cellules sur le site de l'inflammation. Le CCL2 est une chimiokine qui recrute les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes au site de l'inflammation dans le foie blessé. Et aussi, les chimiokines parviennent à agir directement sur la biologie des cellules résidentes du foie, qui sont les cellules stellaires hépatiques et les hépatocytes au cours de l'inflammation et au cours de la fibrogénèse. (Grenard et al., 2005).

La réponse fibro-hépatique accrue observée chez les souris *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* corrèle avec le rôle régulateur essentiel de SOCS1 dans l'activation des macrophages par d'autres stimuli de l'immunité innée et avec le rôle clé des macrophages dans la pathogénèse de la fibrose hépatique (Kinjyo et al., 2002). Dans tous les cas, les macrophages sont très impliqués dans le développement de la fibrose hépatique. En effet, il a été aussi démontré que la destruction des macrophages réduit le développement de la fibrose hépatique chez le modèle murin (J. S. Duffield et al., 2005). Fait important, la perte de SOCS1 dans les macrophages a augmenté la susceptibilité à l'induction de la fibrose hépatique par des agressions moins graves comme l'huile de maïs utilisée comme véhicule pour administrer CCl₄. Comme le promoteur *LysM* est également exprimé dans d'autres cellules myéloïdes et est constitutivement actif dans les neutrophiles (Nakagawa et al. 2002), il est possible que les neutrophiles déficients en SOCS1

puissent contribuer également à la réponse fibrogénique accrue observée chez les souris *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}*. Les neutrophiles sont les premières cellules rapidement recrutées dans le foie lors d'une agression de celui-ci tant dans les conditions stériles que dans les conditions pathogéniques, et ils contribuent ainsi à la lésion des hépatocytes par la libération d'espèces réactives de l'oxygène et de cytokines pro-inflammatoires (Xu et al. 2014). Dans une étude récente, Gao et ses collègues ont montré que les neutrophiles jouent un rôle clé dans la stéatose hépatique et la fibrose hépatique à régime riche en éthanol et en éthanol (Zhou et al. 2018). Dans ce modèle, le GM-CSF et l'IL-15 sécrétés par les CSH activées favorisent la survie des neutrophiles et leur réponse inflammatoire. Il est à noter que SOCS1 est un régulateur de la signalisation d'IL-15 dans les lymphocytes et que l'IL-15 favorise la survie des neutrophiles en régulant à la hausse la protéine anti-apoptotique MCL1 (Ratthe 2004). Des études antérieures ont utilisé des souris *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* dans le contexte d'une inflammation et d'une infection, et certaines ont montré une accumulation accrue de neutrophiles (Hashimoto M et al.2009; Pineros et al.2017). Même si une augmentation ou une accumulation de neutrophiles dans les tissus enflammés des souris *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* peut entraîner une réponse aux macrophages dérégulés, il reste à vérifier si la déficience en neutrophiles augmente également leur survie et leur activation en réponse à l'IL-15 et au GM-CSF, contribuant à la réponse inflammatoire accrue et à la fibrose tissulaire.

Les cytokines inflammatoires favorisent la LF en perpétuant la cascade inflammatoire et induisant la *Tgfb* une cytokine fibrogénique clé, tandis que les facteurs de croissance tels que le *Pdgfb* favorisent la prolifération des HSC. Le traitement par CCl₄ augmente l'expression des gènes *Il6*, *Tnfa* et *Tgfb* chez les souris témoins, tandis que les souris *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* et les souris *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* ont montré des niveaux accrus de transcription de ces gènes, même avec un traitement à l'huile qui est le véhicule, répondant à l'exigence critique de SOCS1 dans la réduction de l'inflammation pour maintenir l'homéostasie tissulaire. Cependant, même si la déficience en SOCS1 n'a pas régulé ces cytokines plus fortement que celles observées chez les souris témoins traités par CCl₄, les souris *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* et *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* ont montré une augmentation marquée de l'expression de *Pdgfb* après le traitement CCl₄ comparé aux souris témoins. Le *Pdgfb* favorise la fibrose hépatique en induisant la prolifération et l'activation des CSH (Kocabayoglu et al. 2016) (Borkham-

kamphorst et Weiskirchen 2016). Comme l'expression de *Pdgfb* se produit principalement dans les macrophages inflammatoires des foies fibrotiques, il est probable que la réponse inflammatoire accrue dans le foie *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* et *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* augmente l'expression de *Pdgfb* chez les macrophages ce qui pourrait contribuer à l'augmentation des myofibroblastes et au dépôt des constituants de la MEC. De plus, les CSH de ces souris peuvent également échapper à d'autres mécanismes de régulation. Premièrement, le TIMP1, qui favorise la fibrose hépatique non seulement en inhibant les MMP mais aussi en favorisant la survie des HSC (Thiele et al.2017), est fortement induit dans les foies des souris *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* traitées par CCl₄ et *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}*. Deuxièmement, ces foies présentaient également une modulation de l'*Ifng*, qui était nettement augmentée chez les souris témoins. L'*Ifng* atténue la fibrose hépatique en inhibant la prolifération des cellules souches hématopoïétiques et leur production de collagène, ainsi qu'en augmentant la destruction à médiation par NK des cellules souches hématopoïétiques activées (Czaja, Weiner et Zern 1989) (Scott L.Freidman., 2008). Par conséquent, une réduction de l'induction d'*Ifng* dans les foies déficients en SOCS1 peut permettre aux HSC d'échapper à la destruction à médiation cellulaire par les NK. Collectivement, plusieurs mécanismes pourraient contribuer à l'augmentation de l'accumulation de HSC et à leur transdifférenciation chez les souris *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* et *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}*.

En ce qui concerne les chimiokines, nos résultats stipulent une augmentation de l'expression de CCL2 et CCL5 chez les souris *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* traitées au véhicule qui pourrait provenir des hépatocytes déficients en SOCS1. Ceci reste à être confirmé chez les hépatocytes déficients en SOCS1 en culture cellulaire. Cependant, une augmentation similaire de l'expression de CCL2 et CCL5 chez les souris *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* traitées avec le véhicule indique l'activation des CSH à la phase effectrice de la cascade fibrogénique qui pourraient être une source majeure de ces chémokines pro-inflammatoires. Aussi, les foies des souris *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* traitées par CCl₄ ont présenté une expression accrue de CX3CR1, qui est principalement exprimée dans les monocytes et les macrophages dérivés de monocytes, cette chimiokine exerce des fonctions anti-fibrogéniques (Marra et Tacke 2014) (Karlmark et al. 2010). Il reste à savoir si la déficience de SOCS1 fait simplement pencher la balance en

faveur de l'inflammation pro-fibrogénique, ou si elle surmonte les fonctions anti-fibrotiques de CX3CR1.

La compréhension des mécanismes qui régulent l'initiation et la progression de la fibrose hépatique nous permettra de mieux intervenir dans le processus de la FH, dans le but d'inhiber la progression de la maladie ou même la faire régresser.

La réponse fibro-hépatique est habituellement associée à une réponse inflammatoire. Pendant ce processus, les cellules immunitaires infiltrantes telles que les monocytes, les neutrophiles, les cellules NK, NKT et les lymphocytes T et B recrutés et les cellules résidentes telles que les cellules de Kupffer participent non seulement à l'initiation, à la progression de la FH et aussi à sa résolution. Par exemple, le phénotype des macrophages dérivés de monocytes, (CD11b + Ly6C^{hi}), favorisent la fibrose en sécrétant TGF- β , PGDF et CCL2. D'autre part, les macrophages (CD11b + Ly6C^{lo}) vont promouvoir la résolution de la fibrose en exprimant des MMPs dégradant les composants de la MEC (MMP-9, 12, 13) et favoriser l'apoptose CSH (Grenard et al., 2005). Les lymphocytes types Th2 et Th17 sont pro-fibrogéniques car elles sécrètent l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-17 qui favorisent la production de collagène, tandis que les cellules Th1 sont anti-fibrogéniques car elles sécrètent de l'IFN γ . Après induction de la FH par CCl₄ chez les souris SOCS1 KO utilisées dans ce projet, les tissus hépatiques ont montré une infiltration de cellules mononucléaires (figure 5).

La caractérisation et la quantification par cytométrie en flux de ces cellules à différents stades de progression de la maladie nous renseigneront sur les types de cellules qui s'infiltrent durant l'inflammation chronique, ce qui donnera plus d'informations sur l'induction de la FH. Il faudra également vérifier si la perte de SOCS1 dans les macrophages fausse la différenciation ou le phénotype du macrophage Ly6C^{hi} versus Ly6C^{lo} et des lymphocytes T (lignées Th1, Th2, Th17) dans les tissus hépatiques fibreux (Grenard et al., 2005).

La caractérisation de l'infiltration des cellules mononucléaires chez des souris KO SOCS1 peut également être étudiée par coloration Immunohistochimie ou par immunofluorescence

des tissus hépatiques pour évaluer l'abondance et la distribution de ces cellules à différents stades de la fibrose hépatique.

La fibrose hépatique chez les souris *Socs1^{fl/fl}Alb^{Cre}* et *Socs1^{fl/fl}LysM^{Cre}* est induite par un produit chimique, soit le CCl₄, tandis que chez l'homme ladite maladie est causée par des facteurs autres que le CCl₄. Il est donc possible que les résultats obtenus dans notre modèle de souris ne s'appliquent pas à la fibrose hépatique chez l'homme.

5. CONCLUSION

Notre projet, centré sur le rôle de SOCS1 dans la fibrose hépatique, démontre que SOCS1 est un régulateur important de la FH, il joue un rôle important de régulateur de la réponse fibro-hépatique chez les hépatocytes et les macrophages. Ainsi, l'expression de SOCS1 dans les hépatocytes peut servir à limiter les dommages cellulaires et la libération de médiateurs pro-inflammatoires qui sont à l'origine de l'initiation de la réponse fibrogénique lors de lésions hépatiques persistantes ou chroniques. Dans les macrophages, SOCS1 peut réguler la perpétuation et l'amplification des réponses inflammatoires. Il contrôle le dépôt des composants de la MEC en régulant l'expression des enzymes de MMP2 et TIMP1, et le facteur de croissance pro-fibrogénique PDGF β et les chimiokines CCL2 et CCL5. D'autres études sont nécessaires pour élucider les mécanismes par lesquels SOCS1 régule les différents acteurs moléculaires de la fibrose hépatique dans différents compartiments cellulaires.

REMERCIEMENTS

Qu'il me soit permis au terme de mes études de maîtrise en immunologie, de remercier mon directeur de recherche, Dr Subburaj Ilangumaran pour m'avoir accepté dans son laboratoire. Sa grande disponibilité en dépit de ses multiples occupations, sa passion pour la recherche et sa rigueur scientifique m'ont été d'un grand apport pour mon épanouissement scientifique. Le climat serein et l'esprit d'équipe qui règnent dans son laboratoire ont été déterminants pour mes recherches. Je voudrais remercier plus particulièrement l'associé de recherche Dr. Diwakar Bobbala, pour son encadreur très dévoué, ainsi que l'assistante de recherche Marian Mayhue pour ses disponibilités et ses remarques pertinentes.

Mes remerciements vont également au professeur Alfredo Menendez pour avoir codirigé ce travail, dont les encouragements et remarques m'ont été d'une importance capitale. Mes sincères remerciements vont également au Dre Sheela Ramanathan pour son soutien et ses encouragements qui m'ont aidé à terminer ce projet.

Je tiens également à remercier les membres du jury, Dre Claire Dubois et Dr. Benoît Paquette, d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire et de faire des suggestions et corrections importantes.

Je profite de cette occasion pour exprimer ma gratitude à Rajani Kandhi pour son soutien et son encadrement tout au long de ce projet. Mes remerciements vont également à mes collègues de laboratoire GM Khan, Madhan, et Sakina. Qu'ils trouvent ici, l'expression de ma reconnaissance.

Je voudrais enfin remercier le Programme Canadien de Bourses de la Francophonie (PCBF) pour avoir pris en charge mes études de maîtrise et mon séjour au Canada. Je remercie enfin le gouvernement de la R.D. Congo pour m'avoir sélectionné.

6. LISTE DES RÉFÉRENCES

- Baetz, Andrea, Christian Koelsche, Julia Strebovsky, Klaus Heeg, and Alexander H Dalpke. n.d. "Identification of a Nuclear Localization Signal in Suppressor of Cytokine Signaling 1." Accessed June 28, 2017.
- Baker, Brandi J, Lisa Nowoslawski Akhtar, and ETTY N Benveniste. 2010. "NIH Public Access" 30 (8): 392–400..
- Balmer, James E., and Rune Blomhoff. 2002. "Gene Expression Regulation by Retinoic Acid." *Journal of Lipid Research* 43 (11): 1773–1808.
- Bechmann, Lars P., and Ali Canbay. 2014. "The Hunt for Treatment Options of Fatty Liver Continues: Effects of Retinoic Acid on Hepatic Steatosis Reveal Novel Transcriptional Interactions of Nuclear Receptors." *Hepatology* 59 (5): 1662–64.
- Block, Timothy M, Siddhartha Rawat, Carol L Brosgart, and San Francisco. 2017. "HHS Public Access" 36 (4): 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.014>. Chronic.
- Borkham-kamphorst, Erawan, and Ralf Weiskirchen. 2016. "Cytokine & Growth Factor Reviews The PDGF System and Its Antagonists in Liver Fibrosis" 28: 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.10.002>.
- Chantrain, Christophe, and Yves A. DeClerck. 2002. "Les Métalloprotéases Matricielles et Leurs Inhibiteurs Synthétiques Dans La Progression Tumorale." *Medecine/Sciences* 18 (5): 565–75. <https://doi.org/10.1051/medsci/2002185565>.
- Czaja, Mark J, R Weiner, and Mark A Zern. 1989. "Y-Interferon Treatment Inhibits Collagen Deposition in Murine Schistosomiasis" 10 (5): 795–800.
- Discher, Dennis E. 2005. "Tissue Cells Feel and Respon to the Stiffness of Their Substrate." *Science* 310 (5751): 1139–43.
- Duffield, Jeremy S JS, Stuart J Forbes, Christothea M Constandinou, Spike Clay, Marina Partolina, Srilatha Vuthoori, Shengji Wu, Richard Lang, and John P Iredale. 2005. "Selective Depletion of Macrophages Reveals Distinct, Opposing Roles during Liver Injury and Repair." *Journal of Clinical ...* 115 (1): 56–65.
- Endo, Takaho A., Masaaki Masuhara, Masahiro Yokouchi, Ritsu Suzuki, Hiroshi Sakamoto, Kaoru Mitsui, Akira Matsumoto, et al. 1997. "A New Protein Containing an SH2 Domain That Inhibits JAK Kinases." *Nature* 387 (6636): 921–24.
- Faria, Silvana C, Karthik Ganesan, Irene Mwangi, Masoud Shieh morteza, Barbara Viamonte, Sameer Mazhar, Michael Peterson, et al. 2009. "MR Imaging of Liver Fibrosis: Current State of the Art." *Radiographics : A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc.*
- Fausto, Nelson, Jean S. Campbell, and Kimberly J. Riehle. 2006. "Liver Regeneration." *Hepatology* 43 (2 SUPPL. 1): 45–53.
- Fenner, Jennifer E, Robyn Starr, Ann L Cornish, Jian-guo Zhang, Donald Metcalf, Robert D Schreiber, Kathleen Sheehan, Douglas J Hilton, Warren S Alexander, and Paul J Hertzog. 2006. "Suppressor of Cytokine Signaling 1 Regulates the Immune Response to Infection by a Unique Inhibition of Type I Interferon Activity" 7 (1): 33–39.
- Fridman, Rafael. 2010. "Matrix Metalloproteinases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803 (1): 1–2.
- Friedman, Sott. 2000. "Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury," no. 10.
- Fukushima, N., N. Sato, F. Sahin, G. H. Su, R. H. Hruban, and M. Goggins. 2003. "Aberrant Methylation of Suppressor of Cytokine Signalling-1 (SOCS-1) Gene in Pancreatic

- Ductal Neoplasms.” *British Journal of Cancer* 89 (2): 338–43.
- Gao, Bin and Bataller, Ramon. 2011. “Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutics Targets.” *Gastroenterology* 141 (5): 1572–85.
- Gisselbrecht, Sylvie. 1999. “Sylvie Gisselbrecht,” 1259–67.
- Grenard, Pascale, Ariane Mallat, and Sophie Lotersztajn. 2005. “Bases Fondamentales Rôle Des Myofibroblastes” 12: 143–52.
- Hyon, Min-kyong, Euna Kwon, Hyung Jun Choi, and Byeong-cheol Kang. 2011. “Dimethylnitrosamine-Induced Liver Fibrosis and Recovery in NOD / SCID Mice.”
- Id, Gene. 2016. “SOCS1 Suppressor of Cytokine Signaling 1 [.]”
- Ide, M., M. Kuwamura, T. Kotani, O. Sawamoto, and J. Yamate. 2005. “Effects of Gadolinium Chloride (GdCl₃) on the Appearance of Macrophage Populations and Fibrogenesis in Thioacetamide-Induced Rat Hepatic Lesions.” *Journal of Comparative Pathology*.
- Inagaki-ohara, Kyoko, Taisuke Kondo, Minako Ito, and Akihiko Yoshimura. 2013. “SOCS , Inflammation , and Cancer,” no. September: 1–10.
- Iredale, J P. 1997. “Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Liver Fibrosis.” *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*..
- Kocabayoglu, Peri, Abigale Lade, Youngmin A Lee, Ana-cristina Dragomir, M Isabel Fiel, Swan Thung, Costica Aloman, et al. 2016. “HHS Public Access” 63 (1): 141–47.
- Lee, Ursula E., and Scott L. Friedman. 2011. “Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis.” *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* 25 (2): 195–206.
- Leroy, Vincent, and M. N. Hilleret. 2005. “Évaluation De La Fibrose Hépatique.” *Hepato-Gastro* 12 (4): 251–59.
- Linossi, Edmond M., and Sandra E. Nicholson. 2012. “The SOCS Box-Adapting Proteins for Ubiquitination and Proteasomal Degradation.” *IUBMB Life* 64 (4): 316–23.
- Manuscript, Author. 2014. “NIH Public Access” 1832 (7): 1061–69.
- Martin, Michelle, and Lynn Matrisian. 2004. “M MPs and Cancer Analyte Matrix Metalloproteinases as Prognostic Factors for Cancer,” no. October: 16–17.
- Naka, Tetsuji, Masashi Narazaki, Moritoshi Hirata, Tomoshige Matsumoto, Seijiro Minamoto, Atsufumi Aono, Norihiro Nishimoto, et al. 1997. “Structure and Function of a New STAT-Induced STAT Inhibitor.” *Nature*.
- Pierre-et-, Université. 2013. “Mécanismes de La Fibrogenèse Hépatique” XIII: 12–15.
- Qin, Xuebin, and Bin Gao. 2006. “The Complement System in Liver Diseases.” *Cellular & Molecular Immunology* 3 (October): 333–40.
- Rebecca G. Wells, Md [Assistant Professor of Medicine], Karen Wallace, Alastair D Burt, and Matthew C Wright. 2008. “Liver Fibrosis.” *The Biochemical Journal* 411 (4): 1–18.
- Roberts, S. K., J. Ludwig, and N. F. LaRusso. 1997. “The Pathobiology of Biliary Epithelia.” *Gastroenterology* 112 (1): 269–79.
- “Rôle de SOCS1 Dans La Progression Tumorale et l’application Thérapeutique - Zhang - 2012 - International Journal of Cancer - Wiley Online Library.” n.d.
- Rottapel, Robert, Subburaj Ilangumaran, Christopher Neale, Jose La Rose, Jenny M.Y. Ho, Melody H.H. Nguyen, Dwayne Barber, Patrice Dubreuil, and Paulo De Sepulveda. 2002. “The Tumor Suppressor Activity of SOCS-1.” *Oncogene* 21 (28): 4351–62.
- Scholten, D, J Trebicka, C Liedtke, and R Weiskirchen. 2015. “The Carbon Tetrachloride Model in Mice.”
- Seki, Ekihiro, and Robert F. Schwabe. 2015. “Hepatic Inflammation and Fibrosis: Functional

- Links and Key Pathways.” *Hepatology*.
- Shirakami, Yohei, Seung Ah Lee, Robin D. Clugston, and William S. Blaner. 2012. “Hepatic Metabolism of Retinoids and Disease Associations.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821 (1): 124–36.
- Starr, Robyn, Tracy A. Willson, Elizabeth M. Viney, Leecia J.L. Murray, John R. Rayner, Brendan J. Jenkins, Thomas J. Gonda, et al. 1997. “A Family of Cytokine-Inducible Inhibitors of Signalling.” *Nature* 387 (6636): 917–21.
- Tacke, Frank, and Henning W. Zimmermann. 2014. “Macrophage Heterogeneity in Liver Injury and Fibrosis.” *Journal of Hepatology* 60 (5). European Association for the Study of the Liver: 1090–96.
- Tallant, Cynthia, Aniebrys Marrero, and F. Xavier Gomis-Rüth. 2010. “Matrix Metalloproteinases: Fold and Function of Their Catalytic Domains.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1803 (1). Elsevier B.V.: 20–28.
- Wells, Rebecca G. 2008. “The Role of Matrix Stiffness in Regulating Cell Behavior.” *Hepatology* 47 (4): 1394–1400.
- Yang, Xiaoqin, Peirong Lu, Yuko Ishida, William A. Kuziel, Chifumi Fujii, and Naofumi Mukaida. 2006. “Attenuated Liver Tumor Formation in the Absence of CCR2 with a Concomitant Reduction in the Accumulation of Hepatic Stellate Cells, Macrophages and Neovascularization.” *International Journal of Cancer* 118 (2): 335–45.
- Yasukawa, H. 1999. “The JAK-Binding Protein JAB Inhibits Janus Tyrosine Kinase Activity through Binding in the Activation Loop.” *The EMBO Journal* 18 (5): 1309–20.
- Yoshida, Takafumi, Hisanobu Ogata, Masaki Kamio, Akiko Joo, Hiroshi Shiraishi, Yoko Tokunaga, Michio Sata, and Hisaki Nagai. 2004. “SOCS1 Is a Suppressor of Liver Fibrosis and Hepatitis-Induced Carcinogenesis The Journal of Experimental Medicine” 199 (12): 1701–7.