



HAL
open science

Stéatose hépatique non alcoolique : implication du stress de réplication dans la progression de la maladie

Romain Donné

► To cite this version:

Romain Donné. Stéatose hépatique non alcoolique : implication du stress de réplication dans la progression de la maladie. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP5100 . tel-04131360

HAL Id: tel-04131360

<https://theses.hal.science/tel-04131360>

Submitted on 16 Jun 2023

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

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

Thèse de doctorat Université de Paris

École doctorale BioSorbonne Paris Cité (ED562)

Département Biologie Cellulaire et Moléculaire, Physiologie, Physiopathologie (BCMPP)

Laboratoire Centre de Recherche des Cordeliers,
Prolifération, Stress, et Physiopathologies hépatiques

STEATOSE HEPATIQUE NON-ALCOOLIQUE : IMPLICATION DU STRESS DE REPLICATION DANS LA PROGRESSION DE LA MALADIE

Présentée par ROMAIN DONNÉ

Thèse de doctorat de physiologie et physiopathologie

Sous la direction du Dr Chantal DESDOUETS

Soutenue publiquement le 23 octobre 2020

Devant le jury composé de

- Rapporteur :** Pr. Isabelle LECLERCQ, Université catholique de Louvain, Belgique
- Rapporteur :** Dr. Pierre Henri GAILLARD, Aix-Marseille Université
- Examineur :** Pr Jessica ZUCMAN-ROSSI, Université de Paris
- Examineur :** Pr. Pierre Emmanuel RAUTOU, Université de Paris
- Examineur :** Dr. Géraldine GENTRIC, PSL Research University



Résumé français

Stéatose hépatique non alcoolique : implication du stress de réplication dans la progression de la maladie

La prévalence de la stéatose hépatique non-alcoolique (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease – NAFLD, en anglais) est en augmentation constante dans les pays industrialisés. La NAFLD se caractérise par une stéatose hépatique induite par une surcharge chronique d'acides gras, qui entraîne une lipotoxicité. Celle-ci est considérée comme un des « hits » majeurs conduisant à la stéatohépatite (NASH). Les hépatocytes effectuent des cycles de lyse-régénération induits suite à une mort chronique suivie d'une prolifération compensatoire. Ces cycles, associés à de la fibrose et une réponse immunitaire, contribuent à augmenter le risque de développer un carcinome hépatocellulaire. Le laboratoire a précédemment démontré, à l'aide de modèles murins de NAFLD, que la division des hépatocytes stéatosiques active la réponse aux dommages de l'ADN (DNA Damage Response – DDR, en anglais), ce qui empêche l'activation de la kinase mitotique (CDK1-cycline B) et conduit à un cycle d'endoréplication. Ces cycles sont considérés comme un programme de division alternatif, sans mitose, dans un contexte de stress génomique. L'objectif de mon doctorat était de déterminer les stigmates de dommages de l'ADN induisant l'activation du DDR et la conséquence sur la progression de la maladie. En utilisant différents modèles murins de NAFLD (High-Fat-High-Sucrose et Choline-Deficient /High-Fat diet), nous avons montré par analyse transcriptomique que la réplication des hépatocytes gras est associée à un ensemble de gènes enrichis dans le point de contrôle G2/M associé à la réparation de l'ADN. Des analyses plus fines par peignage moléculaire montrent que les hépatocytes NAFLD présentent un stress de réplication (SR). Ceux-ci exhibent une réduction de la vitesse de réplication associée à la présence de fourches de réplication à l'arrêt. Concernant la présence de cassures de l'ADN, les hépatocytes NAFLD en cours de réplication affichent des niveaux élevés de γ H2AX avec un marquage pan-nucléaire. Des analyses moléculaires révèlent une activation de la voie ATR via la phosphorylation de CHK1^{s317} et de RPA^{s33}, spécifique des cassures de l'ADN associées à la réplication (dit « simple-brin »). Il est intéressant de noter que seuls les hépatocytes CD-HFD en division présentent des cassures d'ADN double-brin (marquage 53BP1). Par chromatographie liquide combinée à de la spectrométrie de masse, nous montrons que les pools de nucléotides et de dNTPs sont déséquilibrés lors de la division des hépatocytes gras. La supplémentation en dNTPs suffit à diminuer partiellement le SR. Enfin, nous démontrons que le stress de réplication induit l'activation de la voie cGAS-cGAMP-STING menant à une réponse pro-inflammatoire de l'interféron de type I. De façon intéressante, nous avons récemment observé la même signalisation dans les hépatocytes NASH humains, associée à des dommages de l'ADN. Dans l'ensemble, mon doctorat a permis de mettre en évidence la présence d'un stress de réplication associé à des dommages génomiques lors de la division des hépatocytes gras. De plus, l'activation d'un programme inflammatoire par la voie STING pourrait favoriser la progression de la pathologie.

Mots clés : Foie, Hépatocytes, Stéatose hépatique non-alcoolique, Stress de Réplication, DNA Damage Response, Pool de nucléotides, cGAS-STING

Abstract

The pathogenesis of NAFLD: How replication stress participates to disease progression?

The prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is increasing in industrial countries. NAFLD is characterized by hepatic steatosis associated with chronic substrate overload resulting in lipotoxicity: an important mechanism leading to steatohepatitis (NASH). Chronic hepatocyte cell death and compensatory proliferation during NASH with mild/advanced fibrosis and immune response contribute to increased hepatocellular carcinoma risk. We previously demonstrated using mouse models of NAFLD that dividing fatty hepatocytes activate the DNA Damage Response, which precludes the activation of the mitotic kinase (CDK1-cyclinB) and leads to endoreplication. Interestingly, endoreplication is considered as an alternative division program (without mitosis) in a context of genomic stress. The goal of my PhD was to determine DNA damage stigmata inducing the DDR in fatty hepatocytes and the outcome in terms of disease progression. Using different mouse models of NAFLD (High-Fat-High-Sucrose and Choline-Deficient/High-Fat diets), we showed by transcriptomic analysis that replicating fatty hepatocytes harbored an enriched gene set involved in G2/M checkpoint associated to DNA repair. DNA combing and Comet assay show that NAFLD hepatocytes harbor Replication Stress (RS). In fact, we observed a reduction in replication speed with the presence of stalled fork. Regarding the presence of DNA breaks, replicating NAFLD hepatocytes display high levels of γ H2AX with a pan-nuclear pattern staining. Molecular analyses reveal a selected activation of p-ATR/p-RPAS33, specific for single-strand-DNA Breaks. Interestingly, only dividing NASH hepatocytes present double-strand breaks DNA (53BP1 labeling). Liquid Chromatography combined with Mass Spectrometry analyses reveal that nucleotides and dNTP pools are imbalanced during fatty hepatocyte division. Importantly, dNTPs medium-supplementation partially rescued the RS. We finally demonstrated that single-stranded DNA fragments are released in the cytosol of damaged fatty hepatocytes and induce the activation of the cGAS-cGAMP-STING pathway leading to a pro-inflammatory type I interferon response. Importantly, we recently observed the same signaling in human NASH hepatocytes associated to DNA damage. Altogether, my PhD shed new light on the mechanism by which dividing fatty hepatocytes might promote NASH progression.

Key words: Liver, Hepatocytes, Non-alcoholic steatohepatitis, Replication stress, DNA Damage Response, Nucleotide pool, cGAS-STING

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	7
REMERCIEMENTS	13
ABREVIATIONS	25
LISTE DES TABLES ET FIGURES.....	31
AVANT-PROPOS	35
INTRODUCTION.....	39
<u>I. L'INCROYABLE POLYPLOÏDIE HEPATOCYTAIRE</u>	<u>40</u>
1 Généralités sur le foie.....	40
1.1 La structure du foie : Organisation spatiale et diversité cellulaire	40
1.2 Fonctions particulières hépatiques	43
1.3 Mythe de Prométhée & Régénération hépatique	45
2 La polyplôidie hépatocytaire	48
2.1 Généralités.....	48
2.2 Les mécanismes de polyplôidisation	50
2.2.1 La fusion cellulaire.....	50
2.2.2 L'endoréplication : Endocycle et Endomitose	50
2.2.3 La cytotidérèse incomplète.....	52
2.3 La polyplôidie hépatocytaire physiologique.....	55
2.3.1 Mécanisme de polyplôidisation hépatocytaire.....	55
2.3.2 Conséquences et fonctions de la polyplôidisation hépatocytaire.....	58
<u>II. LA STEATOSE HEPATIQUE NON-ALCOOLIQUE – NAFLD.....</u>	<u>62</u>
1 La NAFLD : une maladie chronique du foie.....	62
2 La stéatose hépatique non-alcoolique : présentation de la pathologie	63
2.1 La stéatose hépatique non-alcoolique	63
2.2 La prévalence de la NAFLD.....	64
2.3 Les modèles d'études de la NAFLD.....	66
3 La stéatose hépatique : une reprogrammation métabolique	74
3.1 Le métabolisme hépatique en condition physiologique	74
3.1.1 Le métabolisme en période postprandiale	74
3.1.2 Le métabolisme en période de jeûne.....	75
3.2 Dérégulations métaboliques lors de la stéatose hépatique	77
3.2.1 L'absorption des acides gras	77
3.2.2 La synthèse de novo.	78
3.2.3 L'export des lipides.	79

3.3	<i>Les acteurs de la pathogenèse</i>	79
3.3.1	<i>La lipotoxicité</i>	79
3.3.2	<i>Dysfonctions mitochondriales et Stress oxydant</i>	82
3.3.3	<i>Stress du Réticulum Endoplasmique (RE)</i>	84
3.3.4	<i>Signaux pro-inflammatoires</i>	86
3.3.5	<i>Activation de l'inflammasome</i>	86
3.3.6	<i>Recrutement et activation des cellules immunitaires</i>	89
4	<i>Altération de la capacité proliférative dans la NAFLD</i>	93
4.1	<i>Altération de la prolifération</i>	93
4.2	<i>Polyploïdisation pathologique dans la NAFLD</i>	96

III. LA REPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN (DDR) 99

1	<i>La voie du « DNA Damage Response »</i>	99
1.1	<i>Structure protéique des acteurs de la voie</i>	99
1.2	<i>Les acteurs de la voie</i>	100
1.3	<i>Les différentes voies de réparation de l'ADN</i>	101
1.3.1	<i>BER, NER et MMR</i>	101
1.3.2	<i>Réparation par Non-Homologous End-Joining (NHEJ)</i>	103
1.3.3	<i>Réparation par Recombinaison Homologue (RH)</i>	103
1.4	<i>Le stress de réplication</i>	105
1.4.1	<i>La réplication</i>	105
1.4.2	<i>Le stress de réplication</i>	106
1.4.3	<i>Le peignage moléculaire</i>	107
1.4.4	<i>Causes d'un stress de réplication</i>	108
1.4.5	<i>Conséquences d'un stress de réplication</i>	112
2	<i>Pathologies induites par le stress de réplication et le DDR</i>	113
3	<i>Dommages de l'ADN et activation du DDR dans la NAFLD</i>	114
3.1	<i>Comprendre le mécanisme grâce aux modèles murins</i>	114
3.2	<i>Chez le patient NAFLD</i>	117

IV. LA VOIE cGAS/STING 119

1	<i>La voie senseur d'ADN : cGAS-STING</i>	120
1.1	<i>Les acteurs de la voie</i>	120
1.2	<i>Activation de la voie</i>	122
1.2.1	<i>Par de l'ADN extracellulaire</i>	122
1.2.2	<i>Par de l'ADN intracellulaire du soi</i>	123
2	<i>L'activation de la voie cGAS-STING dans la NAFLD</i>	126
2.1	<i>Activation dans le tissu adipeux</i>	127
2.2	<i>Activation dans le tissu hépatique</i>	127
2.2.1	<i>Activation dans les macrophages hépatiques</i>	128
2.2.2	<i>Controverse sur la présence de STING dans l'hépatocyte</i>	130

RESULTATS	135
I. PREAMBULE	136
II. REPLICATION STRESS IN NAFLD HEPATOCYTES DRIVES DNA DAMAGE AND DNA SENSING SIGNALING PATHWAYS.	140
III. CARACTERISATION DES PROFILS DE PLOÏDIE DANS LE CHC	189
DISCUSSION	203
1 <i>Différences d'activation du DDR dans les deux modèles murins NAFLD</i>	204
2 <i>Quelles sont les causes de la diminution du pool de dNTPs dans l'hépatocyte stéatosique ?</i>	209
3 <i>L'activation de cGAS-STING participe-t-il à l'évolution de la maladie ?</i>	214
4 <i>Les cellules endommagées représentent-elles un risque de transformation ?</i>	218
ANNEXES	225
RÉFÉRENCES	269

REMERCIEMENTS

Ces quatre années de thèse ont été une expérience incroyable ! J'ai pu découvrir le monde de la recherche au sein de deux instituts complètement différents : l'Institut Cochin et le Centre de Recherche des Cordeliers. J'ai également eu la chance et l'opportunité de participer à de nombreux congrès nationaux et internationaux, où j'ai pu discuter avec des chercheurs de renommée mondiale. La thèse est aussi, surtout, une expérience personnelle qui permet de grandir, de prendre du recul, de se remettre en question, mais également de s'affirmer, de discuter et d'élargir sa culture et son esprit. J'ai rencontré un grand nombre de personnes qui ont, été acteurs dans cette évolution. Je souhaite les en remercier.

En premier lieu, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je tiens à remercier particulièrement Madame Jessica Zucman-Rossi d'avoir accepté de présider ce jury de thèse, mais également de m'avoir suivi tout au long de ce parcours. Je remercie également les rapporteurs de cette thèse : Madame Isabelle Leclercq, d'avoir fait le déplacement depuis la Belgique ; et Monsieur Pierre-Henri Gaillard depuis Marseille. Je remercie également les deux examinateurs : Madame Géraldine Gentric, ancienne doctorante du laboratoire ; et Monsieur Pierre-Emmanuel Rautou.

Je remercie Monsieur **Pierre-Olivier Couraud**, directeur de l'Institut Cochin de m'avoir permis d'effectuer mes deux premières années de thèse au sein de l'Institut. Cet environnement riche en plateformes et en laboratoires m'a permis de faire des rencontres extraordinaires et d'apprendre de très nombreuses techniques.

Je remercie, une seconde fois, Madame **Jessica Zucman-Rossi**, directrice du Centre de Recherche des Cordeliers, qui nous a permis de s'installer dans de beaux et grands locaux. Je souhaite également vous remercier pour les nombreuses petites discussions que nous avons échangées, aussi bien lors du FASEB meeting à Phoenix, qu'au CRC. Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche clinique.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à Madame **Chantal Desdouets**, ma directrice de thèse. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir cru en mon potentiel dès le M2, et ce, tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir laissé faire mon bonhomme de chemin avec ce sujet fascinant ! Je te remercie aussi surtout de t'être impliquée dans mon envie de découvrir les nouvelles technologies. Comme quoi, frapper à la porte de ton bureau et t'harcéler quotidiennement pour avoir un kit fini par marcher :D. Tu as été l'une des seules à croire au CRISPR et à m'avoir soutenu du début à la fin avec cette idée folle ! Bon...même si, un jour sur deux, on se demande si le CRISPR STING-5 fonctionne ... ! Qu'en est-il donc aujourd'hui ? Je te suis, aussi, très reconnaissant de m'avoir fait participer à ces très nombreux congrès et de m'avoir fait découvrir deux continents ! Des voyages magiques et différents. Merci, merci, merci !!!! Merci pour toute ta confiance, ainsi que les nombreuses « autres tâches » du labo que tu m'as confiées. Merci de m'avoir impliqué dans les collaborations du labo. J'ai adoré ces petits voyages en Allemagne et travailler sur le cholangio (spéciale dédicace). Merci pour ces quatre années passées au laboratoire ! Une première expérience que je n'oublierai pas !

Je souhaite remercier également toutes les personnes de la Team « Desdouets » que j'ai croisé au cours de ce chemin.

Sandrine, notre fraîcheur au quotidien. De « maître de stage » à « copine de sport », nous avons partagé beaucoup de moments professionnels et personnels. Je me rappelle encore du stage d'été à faire des Western blots et à remettre en question ce bon vieux dosage au Bradford. Nous ne comptons plus les manipes de souris effectuées ensemble. Ces quatre années passées avec toi ont été formidables, tu m'as beaucoup appris et soutenu, et nous avons aussi beaucoup rit ! Merci d'avoir supporté mes blagues pas drôles et salaces ! Tu m'impressionneras toujours par ta capacité de gestion, que ce soit des souris, des manipes de *reviewing*, des milles soumissions différentes du papier Lect2, etc... , mais aussi par ta réflexion, notamment en métabo .. parce que la métabo c'est pas simple hein !! Merci de m'avoir traîné à Neones pendant ces 3 ans ! Dire que nous ne serons même pas rentrés dans le MacDo de la Motte-Picquet pour manger des gros burgers au lieu de faire du sport .. et qu'on se l'était promis ! C'est donc un échec ! J'espère que nous resterons toujours aussi proche, à discuter de tout et de rien, des impôts, des prêts immobiliers, des volets, etc...

Myriam. Merci à ma « grande sœur » de labo de m'avoir encadré dès le début de ma thèse. Toujours souriante, pleine d'énergie, de bonne humeur. Je ne garde que de bons souvenirs de notre super « Bou ». Je me souviens encore des heures passées en culture à *coûté* les centaines de boîtes ensemble et de discuter de tout et rien. Merci infiniment pour tout, la bou !

Mathilde. Merci Cadoux pour ta super énergie licornesque, ta rigueur et ta drolitude. Merci pour ton ouverture d'esprit incroyable. 4 années à partager un bureau ensemble, à supporter ton argumentation permanente et ta folie ! Et l'on s'étonne que je sois devenu fou ... Je dis ça, je ne dis rien ! Merci aussi de me forcer à sortir ! Tu sais bien que c'est difficile de trainer papy dehors...

Jocelyne. Merci Jojo d'avoir toujours été là pour nous aider, nous, les « jeunes » du labo. Ton arrivée au laboratoire nous a, à tous, fait beaucoup de bien. Tu savais nous remettre à notre place quand il fallait mais aussi nous aider. Ta générosité et ton humour ont fait que ces deux années passées ensemble étaient fabuleuses. Bon maintenant je dois faire mes Western tout seul, c'est pénible ! ;) Merci pour tout ! (Je sais qu'on te manque un peu quand même !).

Vanessa. Un début un peu compliqué, où nous avons eu du mal à se cerner. Mais une fois le cas, ce fût un bonheur de te côtoyer tous les jours. Ta bonne humeur, tes chansons et ta simplicité font de toi une très belle personne. Ton départ m'a un peu attristé je dois dire. Avoir plusieurs brins de folie dans un labo ça aide ! Je te souhaite tout le bonheur pour la suite.

Manon. Chien et chat. Ce qui nous a caractérisé pendant ces trois années passées ensemble. Je t'ai effectivement rendu au centuple les petites farces que tu me faisais. Mais c'était avec plaisir ! Les petits moments instructifs dans ton bureau furent aussi un réel plaisir. S'instruire sur le développement des MST, ça rebute au final ! Je suis sincèrement heureux que tu t'épanouisses dans ton post-doc. J'espère que nous nous reverrons par la suite !

Marion. Merci à toi d'avoir apporté toute ta bonne humeur et ton sourire au quotidien, pendant ton stage de M2. Nous avons très vite accroché. C'était toujours un plaisir, et c'est toujours le cas, d'échanger, sur la science et le monde qui nous entoure. Tu as cette capacité de prendre du recul sur ce monde et les gens qui m'impressionne ! Je suis persuadé que tu seras un médecin brillant !

Maëva. Ma petite sœur de labo. Quel plaisir de t'avoir encadré pendant ton M2 et par la suite. Toujours à 300% dans ce que tu fais. Impressionnante tant dans la quantité de travail que la diversité. Je t'ai vu grandir tout au long de cette thèse, mais aussi devenir plus confiante. Un sacré bout de chemin effectué, continue à persévérer. Le travail finit toujours par payer. Merci d'avoir toujours été là pour les cultures et les α ML ! Merci d'avoir accepté de venir avec moi en Allemagne quand la manipe devenait trop importante ! Merci pour tous nos échanges, nos confidences, et de m'avoir supporté en permanence (je sais que c'est difficile) !

Pierre. On aura finalement réussi à faire lever ta timidité ! Pari gagné ! Outre ton sérieux, j'ai découvert une personne drôle, avec qui, j'ai eu un énorme plaisir à travailler. Toutes nos discussions sur les animaux CRISPR furent toujours très intéressantes. Merci énormément d'avoir pris en charge tout le côté histologie, que j'aime tant déléguer ! Merci aussi pour tout ton travail effectué ! Et surtout, merci d'avoir supporté mes blagues et mon *ralage* au quotidien !

Saadé. Une arrivée sur les chapeaux de roues avec un voyage illico en Allemagne. Je me rappelle encore de notre visite d'Heidelberg et de nos confidences autour de ce Spritz. Un moment sincère qui nous a permis de nous rapprocher. Nous avons très rapidement appris à nous connaître et ce fut un véritable plaisir. J'ai aussi découvert avec le temps, un Saadé un peu stressé... que je n'aurais imaginé. Mais je suis sûr qu'avec le temps tu arriveras à relativiser ;) Merci pour toutes les discussions que nous avons eu ! Je suis sûr que ce projet STING donnera des résultats super intéressants ! Merci énormément pour tes corrections de l'article !

Christelle. Merci beaucoup pour la joie et le sourire que tu apportes au quotidien ! Il a toujours été très agréable de travailler et de discuter avec toi ! Il me semble même, ne t'avoir jamais écouté râler ... Mais comment fais-tu ? Quel est ton secret ? Merci d'être ce rayon de soleil même dans les jours gris !

Céline. Tu as été un peu difficile à cerner je dois dire. Mais avec le temps, j'ai découvert une personne qui a le cœur sur la main, et, qui est toujours prête à aider les autres ! Je suis sûr qu'en continuant à t'affirmer tu réussiras de très belles choses ! Je te souhaite une belle réussite !

Marie-No. La presque dernière arrivée du labo. J'espère que nous ne t'avons pas fait trop peur, parce que vu d'extérieur, on le sait, on dirait un asile de fous. Cela dit, tu as très vite trouvé ta place ! Merci pour toute la gestion du labo, que ce soit les commandes ou la sécurité. Tu fais un travail monstrueux pour que les *gogolitos* puissent travailler dans les meilleures conditions qui soient. Merci d'être toujours présente pour discuter de tout et rien !

Flora. La petite dernière. Je te souhaite tout plein de courage pour ces années de thèse qui s'annoncent. Comme je te l'ai déjà dit, tu verras, c'est un plaisir de travailler dans ce laboratoire.

Je remercie tous les anciens du labo que j'ai eu le plaisir de rencontrer, notamment **Antoine**, **Anne-Marie** et **Nadia**. Merci à mes stagiaires **Méline** et **Mäeva** de m'avoir supporté, ce fût vraiment un plaisir de vous encadrer et de vous montrer les *trucs et astuces* des techniques.

Je finis par remercier les deux autres chercheurs du laboratoire qui m'ont énormément apportés pendant cette thèse : **Jean-Pierre** et **Séverine**.

Jean-Pierre. Merci JP pour toutes les discussions que nous avons pu avoir. Que ce soit pour parler science, post-doc, vie à New-York, Ce fût un réel plaisir de t'écouter parler science et immunologie ! Et surtout, merci d'avoir toujours complété mes blagues tendancieuses ! Un beau duo de conneries ! Merci de m'avoir toujours écouté et soutenu !

Séverine. Je ne te remercierai jamais assez #SuperMomo pour toute l'aide et le soutien que tu m'as apportés. Nous avons appris à nous connaître un peu tardivement, mais, finalement, ce fût une très belle découverte ;) . Tu es l'une des personnes les plus humbles que je n'ai jamais rencontrée. Mais tu sais aussi dire les choses quand ça ne va pas, et c'est ce que j'apprécie. Merci de m'avoir soutenu et complété dans mes blagues nulles et salaces ! Merci de m'avoir écouté dans les bons comme dans les mauvais moments. Je n'oublierai pas ! Merci merci merci ! Un énorme merci (encore) pour toutes tes corrections et remarques pour le papier et le manuscrit !

Je veux aussi remercier toutes les personnes que j'ai rencontrées pendant ces deux premières années de thèse à l'institut Cochin !

Nathalie, Maryse et Mimi. Merci énormément les filles pour avoir été toujours aussi gentilles et agréables. Merci Nathalie pour ta « grande gueule » au quotidien. Elle nous a bien manqué par la suite ! Merci à vous trois d'avoir été toujours très adorables et d'avoir échangées avec toutes les personnes. Merci à Maryse d'avoir toujours été là, quand je débarquais pour une commande urgente ou un voyage en Allemagne de dernière minute ! Et qu'on ne se le cache pas, vous nous manquez à tous, et on voudrait vous avoir maintenant au CRC !

L'équipe de Sabine Colnot

Sabine. Merci à toi d'avoir collaboré dès le début du M2 avec nous, pour les constructions CRISPR. Ce fût un plaisir de discuter *biomol*. Merci à **Christèle** et **Cécile** pour nos petites discussions café. Ce fût toujours très agréable de discuter avec vous.

Angélique. Merci beaucoup pour tout ton suivi, de Cochin jusqu'au CRC. Merci énormément pour toutes les discussions que nous avons eues, qu'elles soient scientifiques ou générales. Et merci d'avoir toujours été là, que ce soit pour un réactif ou le reste.

Robin. Robinou, ce fût un véritable plaisir de travailler avec toi ! Dès le début nous avons su s'entendre et collaborer ensemble. Un beau travail effectué, même si finalement, un certain nombre de CRISPR ne nous servira pas. Tu as cette capacité de persévérer qui m'impressionne ! Merci pour tous les bons moments passés ensemble ! J'espère sincèrement que nous nous rencontrerons dans l'avenir !

Rozenn. Ma Roro d'amour ! Tu as été pour moi une très grande source d'inspiration ! Tu as toujours su rayonner, que ce soit de ton intelligence comme de ta gentillesse ! Je me souviendrai toute ma vie de cette semaine passée ensemble à Phoenix avec ces cactus typiiiiques qui piquent ! De ce moment, suspendu dans le temps, où nous avons échangé sur nos vies. J'espère que l'on continuera à échanger ! Merci pour tout !

L'équipe de Christine Perret et Béatrice Romagnolo

Merci à **Christine** et **Béatrice** pour les petites discussions dans les couloirs.

Mathilde & Marie. Merci à vous deux pour toutes les petites discussions dans la pièce de culture ! Encore deux exemples de gentillesse et d'intelligence ! Merci pour nos fous rires !

Pascalette. Merci d'avoir partagé tes connaissances scientifiques et d'avoir toujours répondu à mes questions !

L'équipe de Catherine Postic

Catherine. Un immense MERCI pour ton suivi tout du long de cette thèse ! Merci d'avoir toujours été là et d'avoir pointé du doigt les petites failles de l'histoire. Merci pour ta douceur, ta gentillesse et ton humour !

Fadila. Un énorme merci aussi ! Ce fût un véritable plaisir de te rencontrer et de discuter avec toi ! J'espère que le Crispr donnera quelque chose ... L'avenir nous le dira ;)

Lors de mon doctorat j'ai également eu la chance de rencontrer des équipes de différents centres de recherche.

L'équipe de Patrick Revy (Institut Imagine).

Patrick. Sans toi nous n'en serions pas là ! Une collaboration des plus efficaces et agréables qui fût. Merci énormément pour tous nos échanges et nos réunions intéressantes !

Mounia & Marie. Un grand merci pour le temps que vous avez passé à peigner cet ADN ! Mais surtout, un grand merci pour avoir été d'une extrême sympathie et rigueur ! Sans vous, il aurait été difficile de faire bien des choses !

L'équipe de Valérie Paradis (CRI)

Valérie. Merci énormément pour votre gentillesse ! Merci de nous avoir éduqué un peu de recherche hospitalière ! Un véritable plaisir de vous avoir rencontré ! Merci pour votre soutien et suivi tout au long de cette thèse.

Adel. Un grand merci pour ta gentillesse, ton efficacité et ta rigueur ! Merci aussi pour toutes les manipes que tu as faites sur la culture primaire de patients ! J'espère que nous nous rencontrons encore par la suite !

L'équipe de Mathias Heikenwälder (DKFZ, Allemagne)

Un énorme merci à **Mathias** et **Mira** d'avoir rendu possibles ces quelques 8 expériences et aller-retour à Heidelberg. Ce fût un plaisir de *maniper* au sein du centre, mais aussi de discuter avec l'ensemble des étudiants.

Enfin, je souhaite remercier les équipes du CRC de nous avoir si bien accueillis.

L'équipe de Fabienne Foufelle. Merci de nous avoir laissé manipuler dans votre L1 quand le nôtre n'était pas encore en place. Merci **Floriane** pour nos discussions.

L'équipe de Jessica Zucman-Rossi. Un immense merci à cette équipe qui a toujours été là lorsque nous avons besoin d'aide, que ce soit avec les cohortes humaines, les statistiques ou encore l'utilisation de certaines machines. Un très très grand Merci à **Stefano** d'avoir toujours répondu présent, et d'être d'une si grande gentillesse ! Merci également à **Sandra** de m'avoir permis d'utiliser le scanner de Perkin !

Merci à toutes les autres personnes que j'ai rencontrées pendant cette thèse :

Je souhaite également remercier les enseignants de la Fac de Pharmacie de l'Observatoire. Merci pour ces trois années passées avec vous. L'enseignement à vos côtés a été un réel plaisir. C'est l'une des expériences les plus enrichissantes que j'ai eu la chance de réaliser pendant ma thèse. Merci à **Nadia** d'avoir accepté ma candidature. Je me souviens encore de ton appel téléphonique. Merci à **Jean-Louis, Nicolas** et **Stéphanie** pour toutes nos discussions lors des TP. J'espère vous revoir par la suite !

Enfin, je voudrais remercier toutes les personnes des plateformes de Cochin et du CRC, sans qui, nombre des expériences n'auraient jamais pu être effectuées : Merci à **Histim, Génom'IC** et le **CHIC**. Un énorme merci à **Maryline, Thomas ; Sébastien, Franck, Angéline ; Christophe, Kévin** et **Floriane**.

Un énorme merci également à l'animalerie de la Pitié-Salpêtrière qui a toujours parfaitement géré les souris ! Merci Olivier, Emmanuel et Stéfane ! Merci également à l'animalerie du CRC et notamment Aurélie, Carole, Sonia et Valérie.

Je souhaite également remercier Mélanie KOT et Déborah DEPOST secrétaires de l'école doctorale, qui ont toujours répondu à mes questions, et qui ont toujours été disponibles pour l'ensemble des doctorants ! Il est rare de trouver aussi efficaces ! Merci également pour cette gentillesse !

Un grand MERCI à toutes ces personnes (et celles que j'aurais oublié) d'avoir rendu cette expérience si intense, magique et génial !

Un immense Merci à tous ceux qui ont toujours été là et qui m'ont toujours soutenu, les Clermontois, M2iSH et les copains ! Une dédicace à Noémie, ma partenaire de thèse !

Pour finir, je voudrais aussi remercier ma famille de m'avoir apporté un soutien infaillible. Merci à mes **Parents, Alexandre et Guillaume** de m'avoir toujours accompagné dans mes décisions, des plus sérieuses aux plus dingues ! Merci pour votre écoute et nos intenses débats. Finalement les démontages incessants du magnétoscope m'auront permis d'éveiller et de maintenir ma curiosité sur les phénomènes qui nous entourent ! Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir appris toutes ces valeurs ! Merci !

ABREVIATIONS

4-HNE : 4-HydroxyNonEnal

8-OHdG : 8-HydrOxyDeoxyGuanosine

53BP1 : p53-Binding Protein 1

- A -

ACC : Acétyl-CoA Carboxylase

ACP : Acyl-Carrier Protein

ADN (m) : Acide DéoxyRibonucléique
(mitochondrial)

AG : Acides Gras

ALIOS: American Lifestyle-Induced Obesity
Syndrome

APC: Adenomatous Polyposis Coli

APE : Apurinic-aPyrimidinic Endonuclease

ApoB100: apolipoprotéine B100

ATF6 : Activating Transcription Factor 6

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP: Adénosine TriPhosphate

ATR : ATm and Rad3-related protein

- B -

BER/NER: Base/Nucleotide Excision Repair
(Réparation des Bases ou des Nucléotides par
Excision)

BLM : Bloom (Helicase/syndrome)

- C -

CD: Choline-Deficient (Déficiency en choline)

CDK : Cyclin Dependent Kinases
(Kinases dépendantes des cyclines)

cGAS : cyclic GMP-AMP Synthase

cGAMP : cyclic GMP-AMP

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

CHK : CHeckpoint Kinase

ChREBP: Carbohydrate Response Element
Binding Protein

CIN: Chromosomal Instability

(Instabilité chromosomique)

CKI : Cyclin dependent Kinases Inhibitor

CLD : Chronic Liver Disease

(Maladies chroniques du foie)

CldU : chlorodeoxyuridine

CLR : C-type Lectin Receptor

CtIP : CtBP-Interacting Protein

- D -

DAMPs : Damage-Associated Molecular Pattern

DDR : DNA Damage Response

(point de contrôle des dommages de l'ADN)

DEN: DiEthylNitrosamine

DGAT2: Diacylglycerol Acyltransferase 2

DSB : Double-Strand Breaks

(Cassures double-brin de l'ADN)

DMXAA: 5,6-DiMethylXanthenone-4-Acetic Acid

(Activateur de STING chez la souris)

DNA-PK : DNA-dependent Protein Kinase

DNc : DiNucléotide cyclique

(d)NDPs: (Déoxyribo)Nucléotides DiPhosphate

dNTPs: DéoxyriboNucléotides TriPhosphate

- E -

εdA : Exocyclic-DNA Adducts like 1,N(6)-etheno-
2'-deoxyadenosine

EGF: Epidermal Growth Factor

- F & G -

FAS : Fatty Acid Synthase

GST : Gènes Suppresseurs de Tumeurs

- H -

H2AX : variant X de l'histone H2A

HFD: High-Fat Diet

HFHC : High-Fat High-Cholesterol

HFHS : High-Fat High-Sucrose

HGF : Hepatocyte **G**rowth **F**actor
HR (RH) : Recombinaison **H**omologue
 HU : Hydroxyurée
 - I -
IdU : Iododeoxyuridine
 IFN: Interférons
 IFNAR: **IFN**α **R**eceptor
 IGF: Insulin-**G**rowth **F**actor
 IR: Insulino-**R**ésistance
 IRF3: Interferon **R**egulatory **F**actor **3**
 IRE1: Inositol-**R**equiring **E**nzyme **1**
 ISG: Interferon-**S**timulated **G**ene
 - J -> L -
JAK: Janus **K**inase
 JNK : c-Jun **N**-terminal **K**inase **1**
LDN: Lipogénèse *de novo*
 LPS: Lipopolysaccharide
 LT: Lymphocyte **T**
 - M -
MAFLD: **M**etabolic **A**ssociated **F**atty **L**iver
 Disease
 MAPK: **M**itogen **A**ctivated **P**rotein **K**inases
 MCD: **M**ethionin-**C**holine-**D**eficient
 MCL-1: **M**yeloid **C**ell **L**eukemia-**1**
 MD2 : **M**yeloid **D**ifferentiation factor **2**
 MDM2: **M**urine **D**ouble **M**inute **2**
 MEC : **M**atrice **E**xtra**C**ellulaire
 miARN: **m**icro**A**RN
 MMR : **M**is**M**atch **R**epair
 MTP : **M**icrosomal **T**riglyceride **T**ransfer **P**rotein
 MRN: Complexe protéique **M**RE11, **R**AD51, **N**SB1
 - N -
NAC: **N**-**A**cétyl-**C**ystéine
 NAD+ : **N**icotinamide **A**denine **D**inucleotide

NAFLD : **N**on-**A**lcoholic **F**atty **L**iver **D**isease –
 Stéatose hépatique non alcoolique
NAS: **N**AF**L**D **A**ctivity **S**core
NASH: **N**on-**A**lcoholic **S**teato**H**epatitis -
 StéatoHépatite
NF-κB: **N**uclear **F**actor **K**appa-**B**
NHEJ: **N**on-**H**omologous **E**nd-**J**oining
NK(T): **N**atural **k**iller (**T**)
NLR: **N**od-**L**ike **R**eceptor
NLRP(3/6) : **N**OD-**L**ike **R**eceptor family, **P**yrin
 domain containing **3/6**
 - O -
OMS: **O**rganisation **M**ondiale de la **S**anté
 - P -
PAMPs: **P**athogen-**A**ssociated **M**olecular **P**attern
PD-L1: **P**rogrammed cell **D**eath **1** **L**igand **1**
PERK: **P**KR-like **E**R **K**inase
PI3K : **P**hosphatidyl **I**nositide **3** **K**inase
PIKs: **P**hospho**I**nositide **3**-**K**inase (**PI3K**)-related
Kinases
PPAR: **P**eroxisome **P**roliferator-**A**ctivated
Receptors
PRR : **P**attern **R**ecognition **R**eceptor
 - R -
Rb : **R**étinoblastome
RNAseq : **R**NA **s**equencing (Séquençage des
 ARN)
RNR : **R**ibo**N**ucleotide **R**eductase
RE : **R**éticulum **E**ndoplasmique
ROS : **R**eactive **O**xygen **S**pecies
 (Espèces Réactives de l'Oxygène - ERO)
RPA : **R**eplication **P**rotein **A**

- S -

SAC : Spindle **A**ssembly **C**heckpoint
(Point de contrôle d'attachement des chromosomes aux kinétochores)

SAG : Syndrome **A**icardi-**G**outières

SAHF: Senescence **A**ssoiated **H**eterochromatin **F**oci

SASP : Senescent- **A**ssoiated **S**ecreted **P**henotype

SR: **S**tress de **r**éplication

SGLT2: **S**odium-**G**lucose **T**ransport protein **2**

SREBP1c: **S**terol **R**egulatory **E**lement-**B**inding **P**rotein **1c**

ssDNA: **S**ingle **S**trand **D**N**A** (AND simple-brin)

STAT: **S**ignal **T**ransducer and **A**ctivator of **T**ranscription

STING (gt): **S**timulator of **I**Nterferon **G**enes
(**G**olden **T**icket)

- T -

TBK1: **T**ANK-**B**inding **K**inase **1**

TCR: **T** **C**ell **R**eceptor

TMEM173: **T**rans**M**EMbrane protein **173**

TNF α : **T**umor **N**ecrosis **F**actor **α**

TG : **T**ri**G**lycérides

TGF: **T**umor **G**rowth **F**actor

TLR: **T**oll-**L**ike **R**eceptor

- U -

uPA: **u**rokinase **P**lasminogen **A**ctivator

UPR : **U**nfolded **P**rotein **R**esponse

URI : **U**nconventional prefoldin **R**BP5 **I**nteraction

- V -

VIH : **V**irus de l'**I**mmunodéficience **H**umaine

VLDL : **V**ery-**L**ow **D**ensity **L**ipoproteins

VRAC : **V**olume-**R**egulated **A**nion **C**hannels

- W - X -

WD : **W**estern **D**iet

XP : **X**eroderma **P**igmentosum

LISTE DES TABLES ET FIGURES

FIGURE 1. LA STRUCTURE DU FOIE	40
FIGURE 2. ORGANISATION SPATIALE DES CELLULES HEPATIQUES.....	41
FIGURE 3. LA ZONATION HEPATIQUE	45
FIGURE 4. LA REGENERATION HEPATIQUE.....	47
FIGURE 5. DEFINITION DE LA PLOÏDIE.....	49
FIGURE 6. LES MECANISMES DE FORMATION D'UNE CELLULE POLYPLOÏDE.....	53
TABLE 1. LA POLYPLOÏDIE DANS LE REGNE ANIMAL ET VEGETAL	54
FIGURE 7. LA POLYPLOÏDISATION PHYSIOLOGIQUE DU FOIE	57
FIGURE 8. REPARTITION MONDIALE DES CANCERS DU FOIE EN FONCTION DE L'INCIDENCE.....	62
FIGURE 9. SEQUENCE D'EVOLUTION DE LA STEATOSE HEPATIQUE NON-ALCOOLIQUE.....	64
FIGURE 10. LA PREVALENCE DE LA NAFLD DANS LE MONDE.....	65
TABLE 2. MODELES MURINS PERMETTANT DE RECAPITULER LA NAFLD	70
FIGURE 11. LE METABOLISME HEPATIQUE	76
FIGURE 12. DEREGULATIONS METABOLIQUES LORS DE LA STEATOSE.....	81
FIGURE 13. PRESENCE D'UN STRESS OXYDANT LORS DE LA NAFLD	83
FIGURE 14. LE STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE DANS LA NAFLD.....	85
FIGURE 15. ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME DANS LA NAFLD	88
FIGURE 16. RECRUTEMENT ET ACTIVATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE DANS LA NAFLD	92
FIGURE 17. INSTALLATION D'UNE PLOÏDIE PATHOLOGIQUE DANS LA NAFLD.....	97
FIGURE 18. DOMAINES STRUCTURAUX DES PROTEINES ATM, ATR ET DNA-PK	99
FIGURE 19. REPARATION DE L'ADN PAR BER, NER ET MMR	102
FIGURE 20. REPARATION DE L'ADN PAR C-NHEJ ET HR	104
FIGURE 21. LA REPLICATION	105
FIGURE 22. SIGNALISATION COMMUNE ATM ET ATR.....	106
FIGURE 23. LE PEIGNAGE MOLECULAIRE	107
FIGURE 24. LES CAUSES D'UN STRESS DE REPLICATION	110
FIGURE 25. VOIES DE SYNTHESE DES DNTPs.....	111
FIGURE 26. LA VOIE CGAS/STING	121
FIGURE 27. LA DEFICIENCE DE SAMHD1 CONDUIT A L'ACTIVATION DE LA VOIE CGAS/STING.....	125
FIGURE 28. EXPRESSION DES ACTEURS CGAS ET STING DANS LES ORGANES	126
FIGURE 29. STING, UN ACTEUR IMPORTANT DANS L'AGGRAVATION DE LA NAFLD	130

FIGURES DES RESULTATS

GRAPHICAL ABSTRACT	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
FIGURE 1 (30). NAFLD HEPATOCYTES EXPERIENCE REPLICATION STRESS WITH THE ACTIVATION OF THE S-PHASE CHECKPOINT.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
FIGURE 2 (31). REPLICATION-ASSOCIATED DNA LESIONS ARE ACCUMULATED IN PROLIFERATING NAFLD HEPATOCYTES.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
FIGURE 3 (32). REPLICATION STRESS IN NAFLD HEPATOCYTES IS INDUCED BY NUCLEOTIDES POOLS IMBALANCE.	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
FIGURE 4 (33). THE REPLICATION STRESS INDUCED IN NAFLD HEPATOCYTES PROMOTES CGAS/STING PATHWAY ACTIVATION	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
FIGURE 5 (34). LIPID OVERLOAD LEADS TO REPLICATION STRESS AND INDUCE STING ACTIVATION IN HEPARG CELLS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
FIGURE 6 (35). HUMAN NAFLD LIVERS DISPLAY ALTERATION OF NUCLEOTIDE BIOSYNTHESIS AND CGAS/STING PATHWAY ACTIVATION.	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
SUPPLEMENTAL FIGURE 1 (36): LONG-TERM HFHS AND CDHFD DIETS LEAD TO METABOLIC SYNDROME IN C57BL/6J MICE	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
SUPPLEMENTAL FIGURE 2 (37): ALTERATION OF S PHASE PROGRESSION IN PROLIFERATING NAFLD HEPATOCYTES.	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
SUPPLEMENTAL FIGURE 3 (38): NUCLEOTIDE METABOLISM REPROGRAMMING IN MURINE NAFLD LIVER PARENCHYMA.	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
SUPPLEMENTAL FIGURE 4 (39): METABOLOMIC ANALYSIS REVEALED NUCLEOTIDES POOLS IMBALANCE IN PROLIFERATING NAFLD HEPATOCYTES.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
SUPPLEMENTAL FIGURE 5 (40): METABOLOMIC ANALYSIS IN HUMAN NAFLD LIVER PARENCHYMA.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
FIGURE 41. PRESENTATION DE LA « MACRO ».....	191
FIGURE 42. LA PERTE DE LA SIGNALISATION ATR LORS DE LA DIVISION DE L'HEPATOCYTE STEATOSIQUE PROVOQUE LA GENESE DE CASSURES DOUBLE-BRIN ET L'ACTIVATION D'ATM	208
FIGURE 43. REGULATIONS METABOLIQUES POUVANT CONDUIRE A LA DEPLETION DU POOL DE DNTPS DANS L'HEPATOCYTE STEATOSIQUE	213
FIGURE 44. ACTIVATION DE LA VOIE CANONIQUE CGAS-STING LORS DU STRESS DE REPLICATION DES HEPATOCYTES STEATOSIQUES.....	217
FIGURE 45. ROLE D'ATR ET ATM DANS LA CARCINOGENESE HEPATIQUE SUR FOND NAFLD	221

Avant-propos

L'équipe, dans laquelle j'ai effectué mes travaux de thèse, s'intéresse depuis de nombreuses années aux processus de polyploïdisation du tissu hépatique dans des contextes physiopathologiques. Avant mon arrivée, l'équipe avait mis en évidence l'existence d'un phénomène physiologique de polyploïdisation des hépatocytes lors du développement post-natal chez la souris. Ces travaux montraient que la genèse d'hépatocytes binucléés se produit par un mécanisme de cytodierèse incomplète. Celle-ci étant notamment induite par une altération de la réorganisation du cytosquelette d'actine au niveau du plan de division ([Margall-Ducos et al., 2007](#)). Par la suite, le laboratoire a mis en évidence que ce mécanisme est contrôlé par l'insuline, hormone connue pour sa régulation métabolique du glucose ([Celton-Morizur et al., 2009](#)).

Dans le même temps, la communauté internationale scientifique mettait en lumière une pathologie induite majoritairement par l'obésité et/ou le diabète: la stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD) capable d'évoluer vers un cancer du foie ([Cohen et al., 2011](#)). Dans cette pathologie, la voie de l'insuline est retrouvée dérégulée. Dans ce contexte, et au vu de ses travaux, mon équipe souhaitait analyser les possibles variations de la polyploïdisation. De façon très intéressante, le laboratoire a mis en évidence qu'un changement de mode de polyploïdisation se met en place. Des hépatocytes mononucléés apparaissent dans le tissu de modèles murins NAFLD mais également chez les patients présentant la pathologie. Ces cellules sont générées suite à l'activation d'un point de contrôle des dommages à l'ADN : le **DNA Damage Response (DDR)** ([Gentric et al., 2015a](#)). Les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de la progression de cette pathologie ont fait l'objet de très nombreux travaux de recherche ces dix dernières années. Des centaines d'acteurs ont été identifiés mais beaucoup de mécanismes restent encore obscurs. Dans ce contexte, le projet de recherche qui m'a été confié lors de mon arrivée, visait à comprendre pourquoi le DDR se met en place lors de la division de l'hépatocyte stéatosique.

Ce manuscrit se compose d'une introduction bibliographique organisée en quatre grands axes majoritaires : L'incroyable polyploïdie hépatocytaire, La stéatose hépatique non-alcoolique - NAFLD, La réponse aux dommages de l'ADN et enfin la voie cGAS/STING. Les travaux de thèse seront ensuite introduits puis présentés sous forme de manuscrit en anglais. Enfin, ce manuscrit s'achèvera sur une discussion des résultats et sur les perspectives envisagées pour la suite de ce projet.

En annexe de ce manuscrit, vous trouverez trois revues (1. – 3.) que j'ai co-écrites avec ma directrice de thèse ainsi qu'un article scientifique du laboratoire pour lequel j'ai participé.

1. « **Polyploidy in liver development, homeostasis and disease** ». [Donné R](#), Saroul-Aïnama M., Cordier P., Celton-Morizur S., Desdouets C. **Nature Review Gastroenterology and Hepatology** 2020., doi.org/10.1038/s41575-020-0284-x

2. « **Cellular and Molecular Mechanisms Controlling Ploidy** ». [Donné R](#), Bou-Nader M and Desdouets C. **Ref module in Life science**, 2018

3.« **Hepatic polyploidy: Dr Jekyll or Mr Hyde** ». [Donné R](#), Saroul M, Maillet V, Celton-Morizur S, Desdouets C. **Médecine Science** 2019., doi: 10.1051/medsci/2019094.

4. « **Hepatospecific ablation of p38 α MAPK governs liver regeneration through modulation of inflammatory response to CCl4-induced acute injury** ». Fortier M, Cadoux M, Boussetta N, Pham S, [Donné R](#), Couty JP, Desdouets C & Celton-Morizur S. **Scientific Report**. 2019 Aug 29. » doi.org/10.1038/s41598-019-51175-z

En quatrième de couverture vous trouverez un poster présenté lors de la fête de la science (2017-2018) à l'institut Cochin. Ce poster a été réalisé par Manon Fortier et moi-même.

INTRODUCTION

I. L'incroyable polyploidie hépatocytaire

1 Généralités sur le foie

1.1 La structure du foie : Organisation spatiale et diversité cellulaire

Le foie, organe le plus volumineux de l'organisme, est composé de deux lobes chez l'Homme (le gauche et le droit) et de deux supplémentaires chez la souris (le médian et le caudé) (Abdel-Misih and Bloomston, 2010). La structure du foie est complexe. Les différentes cellules du foie sont agencées en unités structurales hexagonales appelées « lobules ». Chaque lobule s'organise autour d'une veine centrolobulaire, définissant l'espace périveineux, et d'où partent des travées d'hépatocytes jusqu'à atteindre une triade portale (l'espace périportal) composée d'une veinule porte, d'une artériole hépatique et d'un canal biliaire (Figure 1) (Rappaport, 1980).

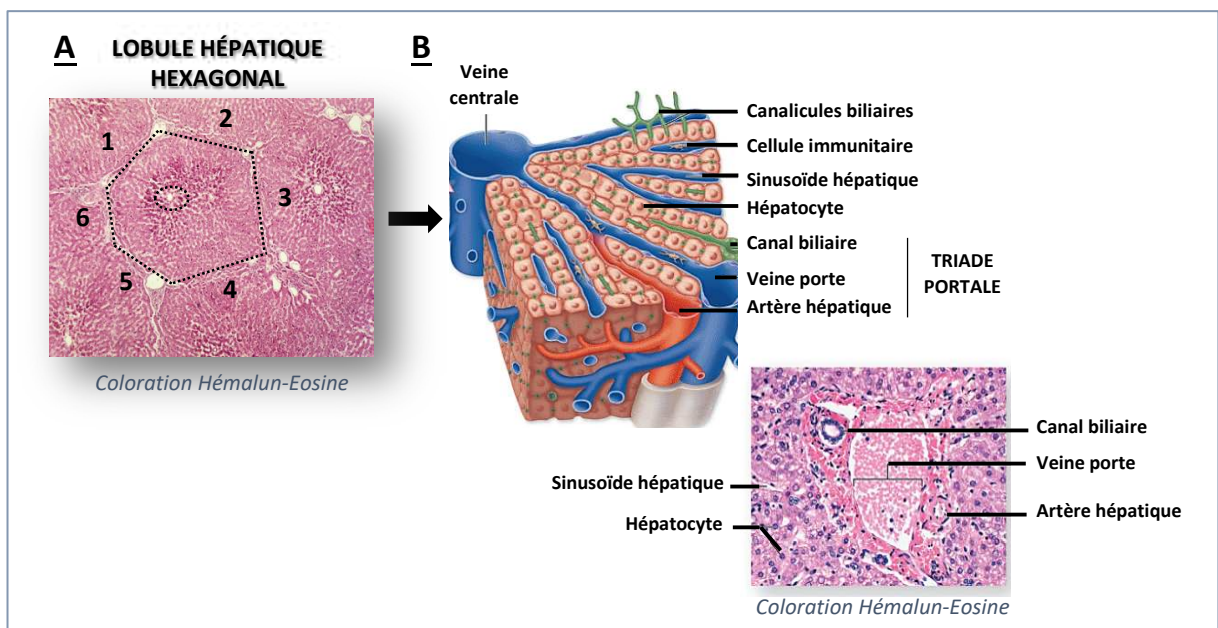


FIGURE 1. LA STRUCTURE DU FOIE

A. Coloration Hémalum-éosine. L'hexagone défini en noir montre un lobule hépatique hexagonal. **B.** Représentation d'un lobule hépatique et de son espace porte à l'aide d'une coloration Hémalum-éosine.

L'une des particularités du foie est sa vascularisation, lui permettant de recevoir plus d'une centaine de litres de sang par heure. Celle-ci se présente sous la forme d'un système à double entrée, le foie est irrigué à la fois par la veine porte (80% de l'apport sanguin) et l'artère hépatique (20%). La veine porte apporte du sang provenant de l'intestin, c'est-à-dire, pauvre en oxygène, riche en nutriments, toxines et antigènes bactériens ; alors que l'artère hépatique apporte du sang provenant du cœur, riche en oxygène. Après avoir circulé dans les différents lobes, le sang épuisé en oxygène et nutriments, se déverse dans la veine centrolobulaire afin de rejoindre la veine cave. Le sang circule le long des travées d'hépatocytes à travers des capillaires sanguins appelés sinusoides hépatiques. Ces capillaires sont constitués d'une monocouche de cellules non jointives et sans lame basale, et possèdent de surcroît de nombreux pores transcytoplasmiques formant une barrière perméable aux macromolécules. Cela forme un espace, appelé « espace de Disse », et permet des échanges bidirectionnels entre les hépatocytes et le sang. On peut également retrouver des cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques (Sheth and Bankey, 2001) (Figure 2).

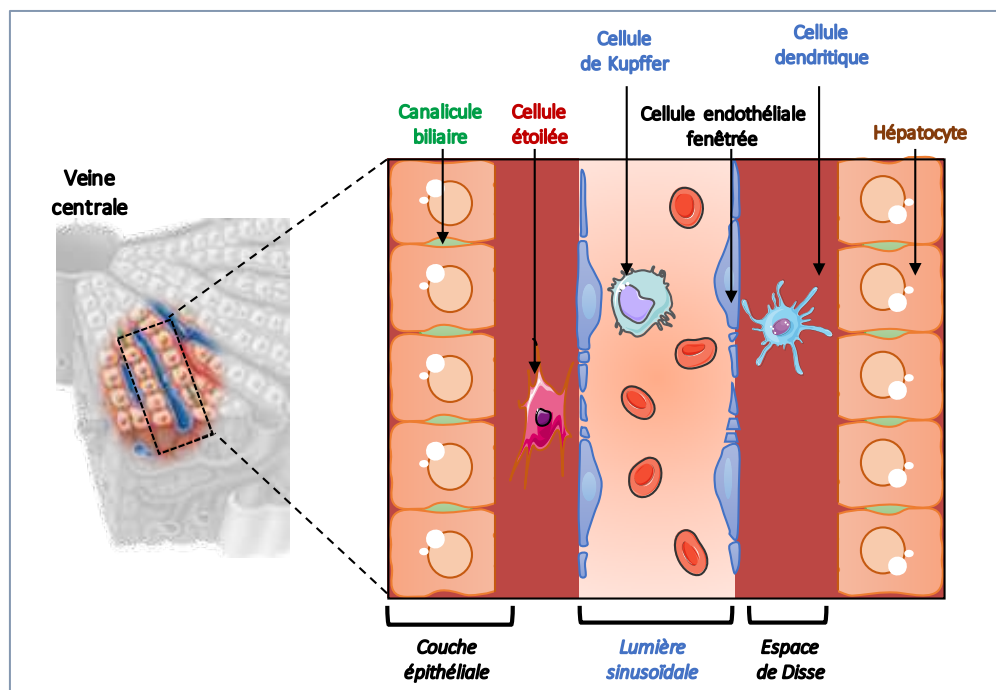


FIGURE 2. ORGANISATION SPATIALE DES CELLULES HEPATIQUES

Représentation schématique des différents types cellulaires : Hépatocytes, Cellules biliaires, Cellules endothéliales, Cellules étoilées et Cellules immunitaires. Les échanges entre le sang et les hépatocytes ont lieu grâce à la présence de fenestrations au niveau des cellules endothéliales. Adaptée d'après (Adams and Eksteen, 2006).

La vaste hétérogénéité de cellules permet au foie d'assurer de très nombreuses fonctions tissulaires. Dans le foie adulte, deux populations cellulaires sont distinguées : les cellules parenchymateuses et non-parenchymateuses. Le premier groupe est constitué des hépatocytes, qui représentent 60% de l'ensemble des cellules hépatiques et 80% du poids de l'organe ; et les cholangiocytes (moins de 1% des cellules). Le deuxième groupe est composé des cellules immunitaires (20%), des cellules endothéliales sinusoidales (environ 20%) et des cellules étoilées (moins de 1%) ([Rappaport et al., 1954](#)).

Les hépatocytes sont les cellules majoritaires du foie et assurent les principales fonctions de cet organe : métabolisme hépatique (glucidique, lipidique, protéique et de l'urée) et détoxification du sang. Ils hébergent notamment un réticulum endoplasmique granuleux et un appareil de Golgi imposants leur conférant des propriétés sécrétoires essentielles : endocrines (sécrétion hormonale ; IGF (Insulin Growth Factor), angiotensine et thrombopoïétine) et exocrine (sécrétion de la bile) ([Weibel, 1969](#)). Il est intéressant de noter que la demi-vie d'un hépatocyte est d'environ 200 jours chez le rongeur et de 400 jours chez l'Homme, expliquant le caractère quiescent du foie et le fait que l'indice mitotique soit extrêmement faible en condition homéostatique ([Macdonald, 1961](#)).

Les cholangiocytes forment un épithélium simple qui constitue les canaux biliaires. Leurs tailles (de 6 à 15 μm de diamètre) et leurs formes (aplaties ou cubiques) varient en fonction de la largeur du canal biliaire qu'ils composent ([Tabibian et al., 2013](#)). Les flux vasculaire et biliaire sont antiparallèles et se croisent au niveau de la triade portale. La bile, produite par les hépatocytes, est recueillie dans les canalicules biliaires, fusionnant par la suite pour former le canal hépatique commun. La bile est ainsi acheminée jusqu'à la vésicule biliaire où elle y est concentrée et stockée ([Rappaport, 1980](#)). Les cholangiocytes sont également impliqués dans la modification de la composition de cette bile, de par la sécrétion de facteurs de croissance et de peptides mais aussi en absorbant des ions, des acides biliaires, des acides aminés ou encore du glucose. De manière intéressante, les cholangiocytes et les hépatocytes ont la même origine embryonnaire, et sont différenciés à partir d'un précurseur bipotent commun : l'hépatoblaste ([Shiojiri et al., 1991](#)).

Les cellules étoilées constituent la population de cellules la moins nombreuse dans le foie, mais présentent un rôle essentiel dans le métabolisme de la vitamine A, stockée dans des gouttelettes lipidiques puis réabsorbée au niveau de l'intestin. Elles montrent des rôles très importants dans la régénération et la fibrose hépatique, en synthétisant notamment du

collagène. Lorsque le foie est lésé, les cellules étoilées reçoivent des signaux provenant des hépatocytes endommagés et des cellules immunitaires, entraînant leur transdifférenciation en myofibroblastes. L'activation prolongée des cellules étoilées induit la production de matrice extracellulaire entraînant la formation de tissu fibrotique, comme c'est le cas lors de la cirrhose (Yin et al., 2013). Par ailleurs, les cellules étoilées activées sécrètent des cytokines pro et anti-inflammatoires mais aussi des chimiokines permettant le recrutement des lymphocytes, leur conférant ainsi une fonction importante dans la tolérance immunitaire (Hsieh et al., 2015).

Les cellules immunitaires représentent 20% des cellules hépatiques totales et se répartissent de façon particulière. Contrairement au sang périphérique, les cellules **Natural Killer (NK)** et **Natural Killer T (NKT)** sont majoritaires par rapport aux lymphocytes T et B. De plus, des cellules présentatrices d'antigènes résidentes - les macrophages de Kupffer - sont également présentes (Sheth and Bankey, 2001). Ces cellules de l'immunité innée et adaptative confèrent au foie des propriétés spécifiques notamment en tant qu'organe tolérogène, mais aussi en permettant une réponse immunitaire rapide et efficace.

1.2 Fonctions particulières hépatiques

Le foie assure un large éventail de propriétés physiologiques essentielles, dont la principale est d'ordre métabolique. Ces fonctions vitales peuvent être regroupées en trois classes principales : le métabolisme, la détoxification et la sécrétion.

Le métabolisme. Le foie est le siège du métabolisme glucidique et lipidique. Nous reviendrons par la suite sur cette fonction particulière, puisqu'elle est retrouvée dérégulée lors de l'installation d'une stéatose hépatique non-alcoolique (voir paragraphe suivant).

La détoxification. Le foie est considéré comme le filtre de l'organisme. De par sa perfusion sanguine particulière, le foie reçoit une partie du sang par la veine porte, riche en composés toxiques endogènes et exogènes. Les toxines liposolubles, l'ammoniaque, la bilirubine, les déchets métaboliques mais encore une majorité des médicaments et l'alcool sont pris en charge par le foie afin de les transformer pour les éliminer. L'ammoniaque, produit dérivé de la synthèse protéique, est pris en charge par le cycle de l'urée au niveau des hépatocytes, ce qui permet la production d'urée, facilement éliminée dans les urines

(Shambaugh, 1977). L'hémoglobine, libérée par la mort des hématies, est convertie en pigments biliaires qui sont ensuite excrétés dans la bile. C'est ce qui lui donne cette couleur jaunâtre. Son accumulation est notamment toxique pour les cellules nerveuses. Concernant l'alcool, l'éthanol ainsi que son produit de métabolisation, l'acétaldéhyde, très toxique pour les organes, sont transformés en acétyl-CoA. Celui-ci est notamment utilisé pour la synthèse des acides gras (AG). C'est pourquoi, une consommation excessive d'alcool peut entraîner une stéatose hépatique (Lieber, 1965). Enfin, les médicaments peuvent être éliminés suite à des réactions enzymatiques différentes qui les rendent, dans la majorité des cas, hydrosolubles et donc facilement éliminables dans les urines ou la bile (Guengerich, 1999).

La sécrétion. Le foie est considéré comme une glande amphicrine homotypique capable de sécrétions endocrines et exocrines. La fonction exocrine du foie consiste en la production de la bile, par les hépatocytes. Environ un litre de bile est produit par jour. Elle est composée à 97% d'eau, d'acides biliaires, de sels biliaires, de phospholipides, de bilirubine et d'ions. Les sels biliaires ont une propriété détergente qui permet la solubilisation des lipides et du cholestérol (Boyer, 2013). Le foie synthétise également des hormones telles que l'« Insulin Growth Factor 1 » (Sjögren et al., 1999), et des protéines, comme l'érythropoïétine (facteur de croissance des précurseurs érythrocytaires) (Göpfert et al., 1997) et la thrombopoïétine (hormone qui stimule la prolifération des mégacaryocytes, cellules productrices de plaquettes) (Wolber and Jelkmann, 2002).

La zonation métabolique. L'arrangement spatial des lobules hépatiques se fait selon l'axe porto-centrolobulaire. Il existe ainsi une hétérogénéité des fonctions physiologiques et biochimiques appelée « zonation métabolique » (Gebhardt and Matz-Soja, 2014). Celle-ci assure l'existence d'un gradient d'oxygène, de nutriments, d'hormones ou encore de cytokines qui permet une régulation des fonctions hépatiques. Par exemple, les mécanismes de β -oxydation et de néoglucogenèse s'articulent en zone périportale, tandis que les processus de lipogenèse, de glycolyse et de détoxification se produisent en zone périveineuse (Birchmeier, 2016). La signalisation Wnt/ β -caténine est l'un des régulateurs essentiels de cette zonation et, est considérée comme le gardien de la zonation hépatique. Cette voie est activée dans les hépatocytes localisés du côté périveineux alors qu'elle est réprimée du côté périportal (Benhamouche et al., 2006) (Figure 3).

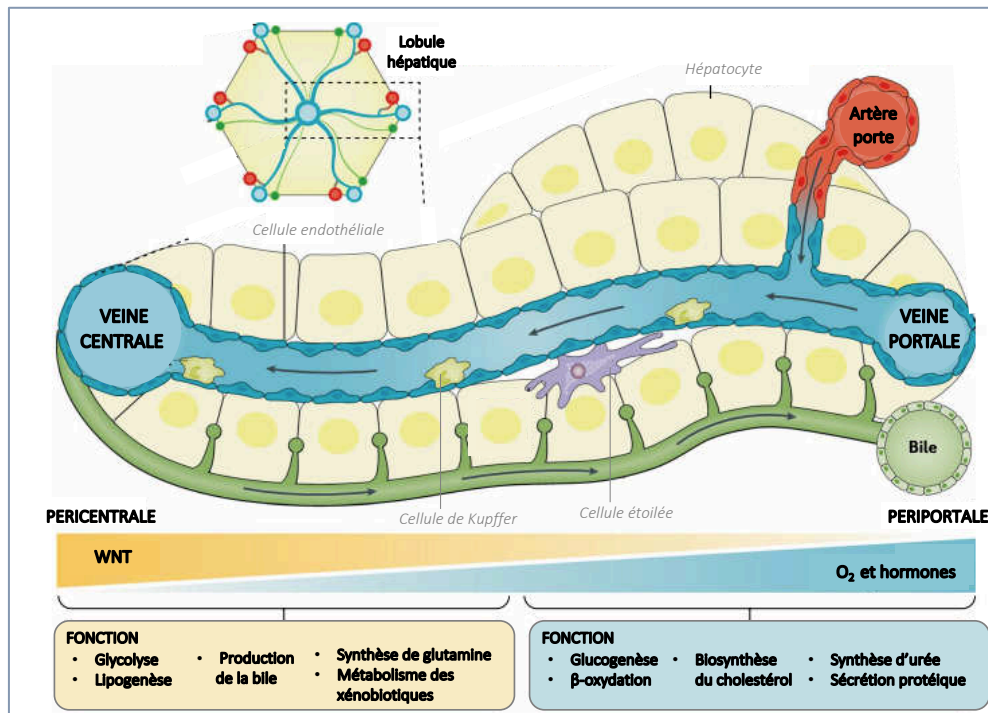


FIGURE 3. LA ZONATION HEPATIQUE

Représentation schématique de la zonation métabolique hépatique. La veine centrale (zone péricentrale) est située à gauche de l'image et la triade portale est représentée à droite. Les flux de sang et de bile vont dans des sens opposés. Les fonctions hépatiques se répartissent au sein du lobule selon l'axe porto-centrolobulaire. Adapté de (Ben-Moshe and Itzkovitz, 2019).

1.3 Mythe de Prométhée & Régénération hépatique

Le foie est aussi un organe doué d'une capacité de régénération lui permettant de rétablir sa masse cellulaire lorsqu'il subit une agression (résection chirurgicale, nécrose cellulaire, etc..) (Taub, 2004). Cette propriété est connue depuis la Grèce Antique et a permis la formulation du fameux mythe de Prométhée. Dans la mythologie, Prométhée a dérobé le feu sacré de l'Olympe et en a fait don aux Hommes. Cependant, pour cette trahison, Zeus le condamne à un rituel de torture quotidien. Il l'enchaîne à un rocher des montagnes du Caucase pour qu'un aigle vienne lui picorer le foie chaque jour. Son foie, repoussant la nuit, permet de nourrir cet aigle quotidiennement et de torturer Prométhée éternellement.

Bien que différenciées et quiescentes, les cellules hépatiques sont capables de proliférer lors d'agressions, c'est ce qu'on appelle « la régénération hépatique ». Ce phénomène unique permet au foie de retrouver sa masse initiale en quelques jours. Dans un cadre temporel bien défini, les différents types cellulaires prolifèrent par vagues successives.

Ces vagues sont induites par la sécrétion séquentielle de signaux mitogéniques hépatiques différents (Michalopoulos and DeFrances, 1997). Durant les quarante-huit premières heures, les hépatocytes sont les premières cellules à rentrer en prolifération et de manière synchronisée. Les jours suivants, les autres types cellulaires, les cholangiocytes, les cellules de Kupffer puis les cellules endothéliales vont également se diviser de manière synchronisée (Stöcker and Heine, 1971). Afin de permettre la régénération complète du tissu hépatique, les hépatocytes se divisent à partir de trois phases successives (Figure 4) : (1) La phase de « priming », (2) La phase de prolifération, et (3) La phase de terminaison. La première phase définit la sortie de quiescence des hépatocytes et initie la réponse proliférative des hépatocytes. Suite à l'hépatectomie, la modification du flux sanguin favorise l'augmentation de la concentration de LPS (Lipopolysaccharide) arrivant par la veine porte depuis les intestins, et conduit à l'activation des cellules de Kupffer (Cornell, 1985). En réponse, ces macrophages produisent du TNF α (Tumor Necrosis Factor α), qui par une boucle d'activation autocrine induit la synthèse d'IL6 (Interleukine 6), via la signalisation NF- κ B (Nuclear Factor κ B). Par une action paracrine, l'IL-6 se fixe à son récepteur sur l'hépatocyte, ce qui entraîne l'activation de la voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) par une cascade de phosphorylations en chaîne, ayant pour finalité l'activation du facteur de transcription STAT3. Cet événement conduit à la transcription des gènes cibles appelés « gènes précoces » (« Immediate early genes ») permettant la transition G0 vers G1 du cycle cellulaire. L'activation de la β -caténine permet aussi de réguler positivement un grand nombre de gènes impliqués dans la prolifération (Cressman et al., 1995; Fausto et al., 2006; Tan et al., 2005). Lors de la deuxième phase, c'est la sécrétion d'EGF (Epidermal Growth Factor), de TGF α (Tumor Growth Factor α) et d'HGF (Hepatocyte Growth Factor) qui favorise le passage de la phase G1 vers la phase S. L'EGF est sécrété par le duodénum et les glandes salivaires, le TGF α par les hépatocytes et l'HGF par les cellules endothéliales et étoilées (Pediaditakis et al., 2001; Skov Olsen et al., 1988). En parallèle, une stéatose transitoire s'installe dans le parenchyme hépatique, définissant la phase métabolique (Delahunty and Rubinstein, 1970). Cette accumulation de triglycérides semble être à la fois une réserve énergétique et une source de phospholipides pour la formation des membranes plasmiques lors de la prolifération hépatocytaire. De façon intéressante, la régénération ne peut se produire sans cette stéatose physiologique, alors qu'une stéatose pathologique déjà installée conduit à un défaut de régénération après hépatectomie partielle (Rudnick and Davidson, 2012). Après la transition

G1/S, les hépatocytes progressent en phase S, G2 et mitose, indépendamment de cytokines ou de facteurs de croissance. Après un à deux cycles de division, la masse hépatique est restaurée, la sécrétion de TGFβ par les cellules étoilées ainsi que la signalisation des intégrines, permettent de terminer le processus (Gilgenkrantz and Collin de l'Hortet, 2018).

Différents modèles *in vivo* ont été développés pour étudier ces différents mécanismes : (1) La régénération dite physiologique induite suite à une hépatectomie partielle qui reconstitue une ablation clinique ou (2) celle induite de façon pathologique à la suite d'administration de produits chimiques pouvant mimer des hépatites fulminantes induites par des composés médicamenteux comme le paracétamol (Fortier et al., 2019; Mao et al., 2014).

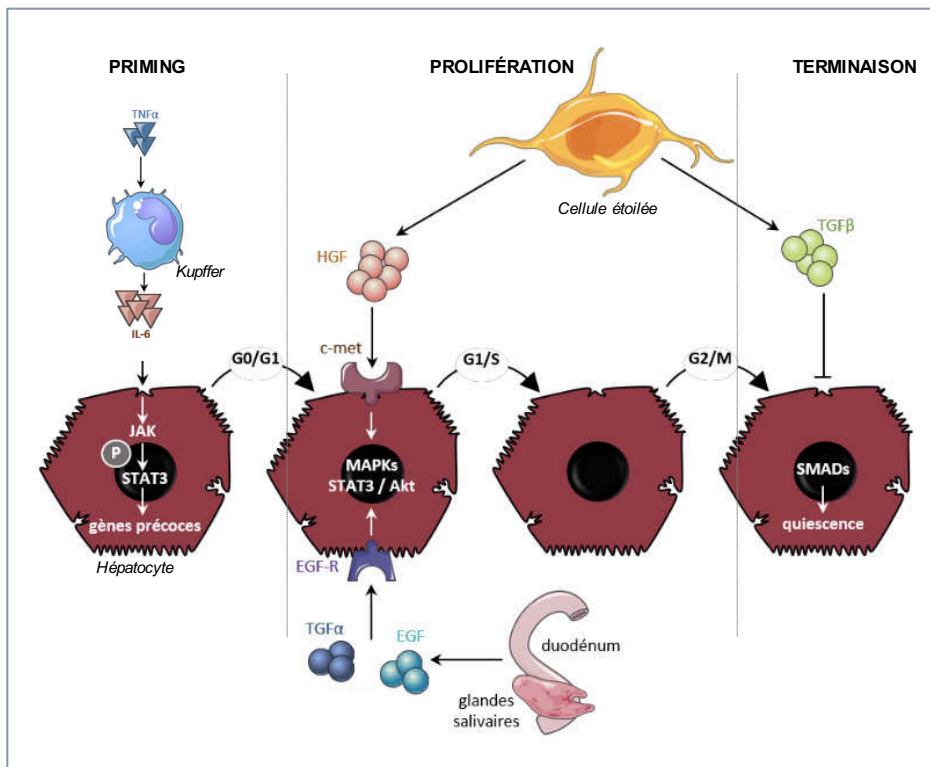


FIGURE 4. LA REGENERATION HEPATIQUE

Schéma illustrant la signalisation cellulaire et moléculaire à la suite d'une hépatectomie partielle pour la prolifération des hépatocytes. La phase de priming est nécessaire à la sortie de quiescence de l'hépatocyte. Les cellules de Kupffer vont initier la phase en sécrétant l'IL-6. Ensuite, les cellules étoilées sécrétrices d'HGF permettent la prolifération des hépatocytes en synergie avec l'EGF sécrété par les glandes salivaires et duodénum et le TGFα sécrété de façon autocrine par l'hépatocyte. Enfin, la sécrétion de TGF-β par la cellule étoilée permet le retour en quiescence de l'hépatocyte. Adapté de (Taub, 2004).

2 La polyplôidie hépatocytaire

2.1 Généralités

Le chromosome est le support de l'information génétique propre à chaque être vivant. On le retrouve sous deux formes : circulaire chez les bactéries et linéaire chez les eucaryotes. Chez ces derniers, les chromosomes sont logés dans le noyau et leurs nombres diffèrent en fonction des espèces. A titre d'exemple, la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) possède $n=8$ chromosomes, la souris (*Mus musculus*) possède $n=20$ chromosomes, l'Homme (*Homo sapiens*) possède $n=23$ chromosomes et le rat piscivore d'Équateur (*Anotomys leander*) possède $n=46$ chromosomes. Toutes ces espèces sont diploïdes ($2n$), c'est-à-dire qu'elles possèdent deux jeux de chaque chromosome. On désigne par « n » le nombre de jeu(x) de chaque chromosome, définissant ainsi la « ploïdie ». Par définition, on appelle haploïde une cellule qui possède une seule copie de chaque chromosome (n) ; et diploïde ($2n$), une cellule qui contient deux copies (Figure 5A) (O'Brien S, 2006).

Dans le règne animal, la diploïdie est retrouvée de façon majoritaire, et est considérée comme « l'état normal » de ploïdie. Chez les mammifères, la polyplôidisation d'un organisme entier est rare, car elle entraîne une létalité précoce, ainsi que des avortements spontanés ou des résorptions embryonnaires (Creasy and Alberman, 1976; Kaufman, 1991). Cependant, il existe deux exceptions. En effet, deux rongeurs cousins possèdent des génomes tétraploïdes : il s'agit du rat viscacha (*Tympanoctomys barrerae*) et du rat viscacha doré (*Pipanacoctomys aureus*). Toutefois dans le règne végétal, il n'est pas rare de trouver des espèces tétraploïdes (Gallardo et al., 1999).

La présence de jeux additionnels de chromosomes ($>2n$) définit la polyplôidie (triploïde, tétraploïde, etc...). La polyplôidisation ou « duplication génome-entier » peut être induite par deux mécanismes différents : (1) L'autopolyploïdisation, par duplication d'un même génome parental ou (2) L'allopolyplôidisation, par fusion de deux génomes issus d'espèces ou de cellules différentes (hybridation). Attention toutefois de bien dissocier la polyplôidie de l'aneuploïdie, qui se caractérise par des modifications numériques (gain ou perte) et/ou structurelles (réarrangements) d'un ou plusieurs chromosomes (pour un génome diploïde : $2n \pm x$) (Davoli and de Lange, 2011).

Il est également intéressant de noter que les espèces diploïdes possèdent des stigmates d'une polyploïdie ancestrale. En effet, des événements de polyploïdisation sont intervenus au cours de l'évolution des vertébrés, notamment dans la période qui a suivi l'extinction des dinosaures (Van de Peer et al., 2009, 2017). Cette paléo-polyploïdie, semble expliquer les nombreux paralogues de certains gènes rencontrés dans les génomes de mammifères, tels que Hox (Schughart et al., 1989), E2F ou Rb (protéine du rétinoblastome) (Cao et al., 2010). Chez l'Homme, il semblerait même que 74% des gènes de signalisation descendent de ces événements de duplication du génome complet (Huminiacki and Heldin, 2010).

Enfin, la polyploïdisation peut avoir lieu au sein d'un organisme entier mais également à l'échelle cellulaire, au niveau de certains tissus. Chez les mammifères diploïdes, on retrouve dans différents organes, la présence de cellules polyploïdes. Ces variations du nombre de chromosomes peuvent se situer au sein d'un seul noyau définissant la ploïdie nucléaire (cellule polyploïde mononucléée) ou au sein de la cellule par une augmentation du nombre de noyaux (cellule polyploïde binucléée/multinucléée) (Figure 5B) (Gentric et al., 2012).

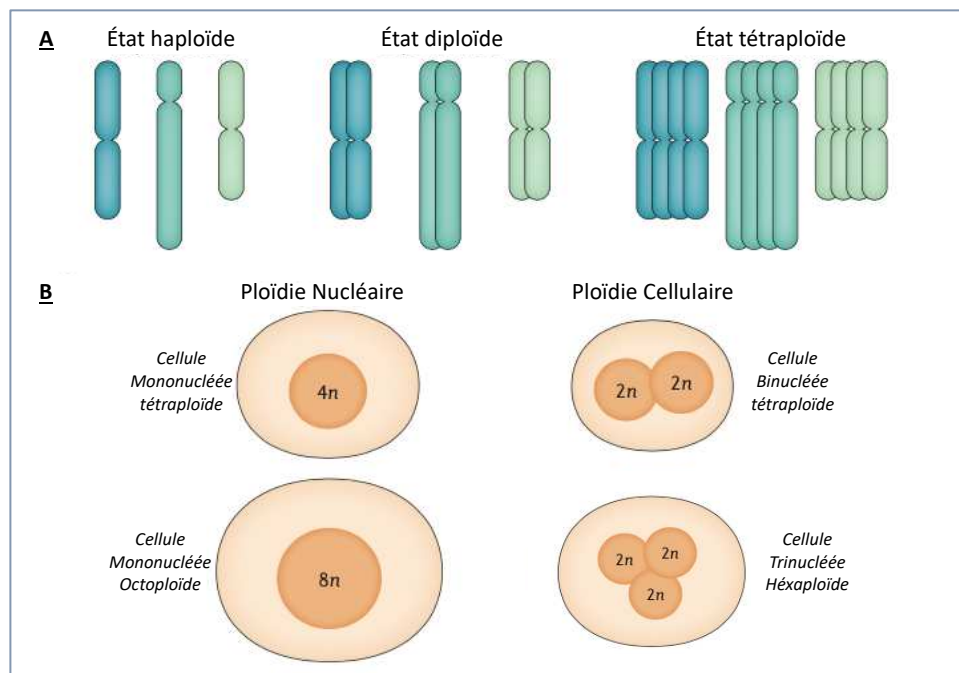


FIGURE 5. DEFINITION DE LA PLOÏDIE

A. Schématisation de l'état de ploïdie. **B.** Schématisation des types de ploïdie : Nucléaire et Cellulaire. Adapté de (Donne et al., 2020).

2.2 Les mécanismes de polyploïdisation

La fusion cellulaire est le seul mécanisme qui n'est pas induit par un défaut dans le cycle de division de la cellule. Les trois autres, qui sont l'endocycle, l'endomitose et la cytotérière incomplète mettent en jeu une altération de la division cellulaire.

2.2.1 La fusion cellulaire

Il existe de nombreux organismes (levures, nématodes, mammifères) et types cellulaires (gamètes, myoblastes, macrophages, cellules épithéliales, ...) capables d'effectuer des fusions cellulaires afin de maintenir l'homéostasie tissulaire. La reconnaissance des cellules se fait par l'intermédiaire de ligand(s) et de récepteur(s) (Chen et al., 2007). Un premier signal permet aux cellules de rentrer dans un état de « compétence fusionnelle » et de créer des interactions entre de nombreuses protéines de la membrane plasmique (fusogènes). L'ensemble de ces interactions active des voies de signalisation qui conduisent à des modifications du cytosquelette et finalement à la fusion des membranes plasmiques (Figure 6A) (Aguilar et al., 2013). Ce mécanisme mène le plus souvent à la formation d'une cellule multinucléée hautement différenciée (Gruenbaum-Cohen et al., 2012; Laurin et al., 2008; Millay et al., 2013). Par exemple, lors de la différenciation du tissu musculaire au niveau embryonnaire, les myoblastes effectuent des fusions homotypiques pour former des *syncytia* de myoblastes appelés myotubes (Hindi et al., 2013; Schejter, 2016). La fusion cellulaire peut également survenir lors d'infections virales. Par exemple, l'infection par le *Papillomavirus* humain, responsable des cancers du col de l'utérus, induit l'apparition de cellules tétraploïdes binucléées par ce phénomène (Hu et al., 2009).

2.2.2 L'endoréplication : Endocycle et Endomitose

Chez les mammifères, le cycle cellulaire comporte quatre phases successives : G1 (Gap 1), S (Réplication), G2 (Gap 2) et M (Mitose). L'ensemble de ces étapes est contrôlé par une famille de protéines : les sérine/thréonine kinases dépendantes des cyclines (CDK – *Cyclin Dependent Kinases*) dont l'activité est dépendante de l'association avec des protéines appelées cyclines. Ces complexes Cyclines/CDK régulent les différentes étapes du cycle : Les S-CDK (CDK2 – Cyclines E/A) permettront l'entrée en réplication et les M-CDK (CDK1 – Cyclines A/B) induiront l'entrée en mitose (Hochegger et al., 2008). Le cycle cellulaire est finement contrôlé, la mitose

ne pourra commencer qu'après la réplication complète du génome (Hartwell and Weinert, 1989) (Figure 6B).

L'endoréplication est un cycle cellulaire alternatif dans lequel la cellule réplique son ADN mais n'effectue ni caryodiérèse (séparation des chromosomes) ni cytotdiérèse (division cellulaire). Le mécanisme général de l'endoréplication résulte de régulations différentielles depuis la phase S (Endocycle) jusqu'au début de la mitose (Endomitose) (Table 1).

L'**endocycle** nécessite deux événements essentiels : **(1)** l'inhibition de la transition G2/M par la protéolyse de la cycline B1, et **(2)** l'oscillation de l'activité des CDK, afin d'initier une nouvelle réplication génomique en l'absence de division cellulaire. Ces régulations moléculaires ont des causes différentes mais conduisent à la genèse d'une cellule polyploïde mononucléée. Lors de l'endocycle, la cellule alterne les phases G et S sans jamais initier la mitose (Figure 6C). Les cellules géantes trophoblastiques murines sont des cellules polyploïdes différenciées à partir du trophoctoderme lors de l'embryogenèse. C'est la privation du facteur de croissance FGF4 qui a pour conséquence une augmentation de l'expression de l'inhibiteur de CDK (CKI) p57^{Kip2}. Cette CKI inhibe l'activité du complexe M-CDK (CDK1/Cycline B) ce qui conduit à la genèse d'une cellule tétraploïde mononucléée. L'oscillation concomitante de S-CDK (CDK2/Cycline E) et p57^{Kip2} conduit à une ré-initiation de la phase S puis à une sortie de cycle par endocycle. Cette oscillation aboutit à la formation de cellules trophoblastiques géantes dont la ploïdie peut atteindre 512n. Ce processus semble crucial pour l'implantation du blastocyste à l'endomètre (Hattori et al., 2000; Ullah et al., 2008).

L'**endomitose** permet l'entrée en mitose, mais la cellule n'effectue pas les étapes d'anaphase et de cytotdiérèse (Figure 6D). C'est l'activation du « Spindle Assembly Checkpoint » (SAC) qui entraîne une dégradation progressive de la cycline B1. Le SAC est activé à la suite d'un problème d'attachement des microtubules aux kinétochores des chromosomes (Edgar and Orr-Weaver, 2001). L'activation prolongée du SAC conduit soit à une catastrophe mitotique (mort par apoptose dépendante d'erreurs en mitose), soit à un échappement de la mitose et un retour en G1 par le phénomène de glissement mitotique (ou « mitotic slippage »). Dans le cas d'un cancer, ces deux mécanismes induisent de façon respective, la mort des cellules cancéreuses et une rémission, ou, un échappement par le glissement mitotique et donc une progression tumorale (Kang et al., 2010). Ce mécanisme est souvent retrouvé dans les cancers, comme dans le cancer colorectal. Les cellules cancéreuses mutées pour le gène *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), dont la protéine est importante pour le maintien des fuseaux de

microtubules mitotiques, effectuent un glissement mitotique. On retrouve ainsi des cellules polyploïdes mononucléées dans ce cancer (Dikovskaya et al., 2007).

2.2.3 La cytodiérèse incomplète

La cytodiérèse est la dernière étape de la division cellulaire. Elle permet la séparation de la cellule mère en deux cellules filles avec une séparation du matériel génomique et cytoplasmique. Cet événement finement contrôlé fait intervenir quatre phases essentielles : **(1)** La définition du plan de division, **(2)** La formation du plan de division, **(3)** La contraction de l'anneau d'actomyosine, et **(4)** L'abscission permettant la séparation des deux cellules filles (**Figure 6E**). Une anomalie lors de ce processus induit un arrêt appelé « cytodiérèse incomplète » et la formation d'une cellule polyploïde binucléée (Lens and Medema, 2019). Cet arrêt peut être induit de différentes façons : **(1)** une obstruction physique ayant lieu au niveau du site de clivage par un chromosome mal ségrégué ; **(2)** Une altération dans l'expression des gènes régulant la cytodiérèse (Lens and Medema, 2019). Ce processus peut toutefois apparaître dans certains tissus comme dans le cœur et le foie à l'état physiologique (**Table 1**) (Clubb and Bishop, 1984; Guidotti et al., 2003a; Oparil et al., 1984). La croissance du cœur commence durant l'embryogenèse selon un phénomène d'hyperplasie (prolifération). Cependant, après la naissance, les cardiomyocytes perdent leur capacité de prolifération et vont croître par un phénomène d'hypertrophie (binucléation) qui permet une augmentation de leur volume d'environ 30 fois (Clubb and Bishop, 1984; Oparil et al., 1984). Ce phénomène est retrouvé dans diverses espèces et couvre 85% des cardiomyocytes chez les rongeurs et 30% chez l'Homme (Bergmann et al., 2015). Li et ses collaborateurs ont mis en évidence que la région « midbody » reste connectée entre les cellules filles, sans rupture, et conduit à la régression du fuseau mitotique. Malgré la présence de l'anneau d'actomyosine, celui-ci ne semble pas suffisamment efficace pour permettre la séparation des cellules filles (Li et al., 1996).

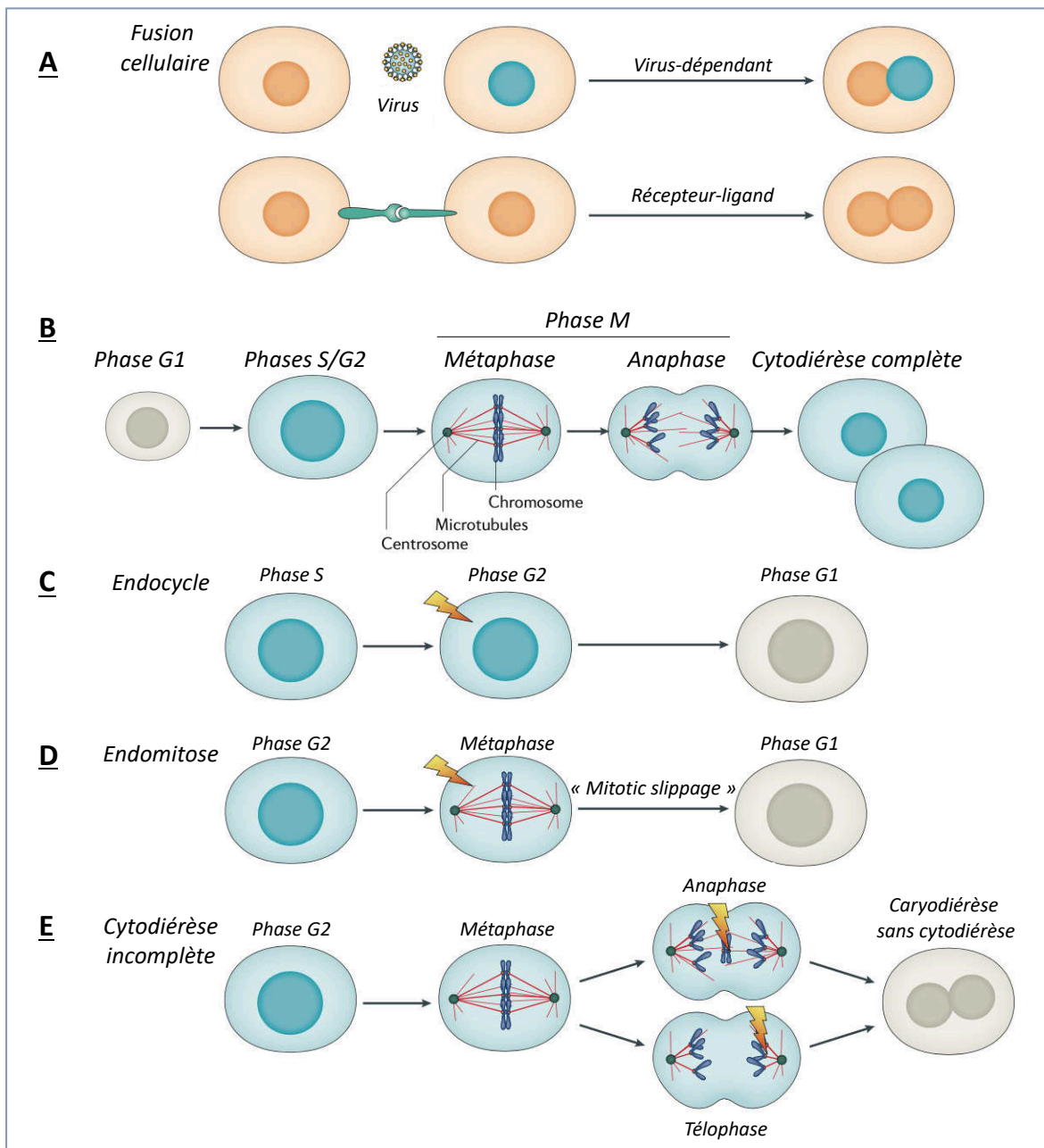


FIGURE 6. LES MECANISMES DE FORMATION D'UNE CELLULE POLYPLOÏDE

A. La fusion cellulaire induite par un virus ou par une association récepteur-ligand conduit à la genèse d'une cellule multinucléée. **B.** Schématisation de la division cellulaire et des phases nécessaires à la séparation des chromatides sœurs (Métaphase & Anaphase). **C.** L'endocycle et **D.** l'endomitose conduisent à la genèse d'une cellule mononucléée polyploïde suite à des reprogrammations en phase G2 ou lors de la métaphase, respectivement. **E.** La cytotiérèse incomplète conduit à une cellule binucléée suite à des reprogrammations en Anaphase ou Télaphase. Adapté de (Donne et al., 2020).

Organisme	Système/Organe	Type cellulaire	Type de polyploïdisation	Fonction ?	Réponse face aux dommages
Arabidopsis	Feuilles et sépales	Cellules géantes	Endocycle (16C)	Contrôle de la courbure des feuilles et des sépales	Endoréplication induits par UV pour réparer
	Feuilles	Trichomes	Endocycle (32C)	Formation et branchements des trichomes	
Nématode C. elegans	Hypoderme	Cellules hypodermales (Hyp7)	Endocycle (12C)	Taille du ver	
Drosophile	Système nerveux	Glie subpéneurale	Endocycle et Endomitose (32C)	Maintien barrière sang/cerveau	
	Intestins	Papilles anales	Endocycle (8C)	Nécessaire pour la formation des papilles et l'absorption des sels et de l'eau	Expositions cytotoxiques: Stimulent la prolifération des cellules souches
	Ovaires	Follicules	Endocycle (16C)	Synthèse de la coquille d'œuf	
		Nurse cells	Endocycle (512C)	Synthèse et transport des stocks maternels vers l'ovocyte	
Limace et Aplysia	Système nerveux	Neurones géants	Endocycle ? (10 000 et 200 000C respectivement)	Innervation	
Souris	Cœur	Cardiomyocytes	Cytodiérèse incomplète (4C-8C)	Croissance et réponse aux dommages	Barrière pour la réparation après lésions
	Sein	Cellules alvéolaires	Cytodiérèse incomplète (4C)	Lactation	
Rongeurs	Placenta	Cellules géantes	Endocycle (512C)	Barrière placentaire ?	
Mammifères (dont Homme)	Sang	Mégacaryocytes	Endomitose (128C)	Production des plaquettes	
	Peau	Kératinocytes	Endocycle et endomitose (12C)	Barrière et protection ?	
	Foie	Hépatocytes	Cytodiérèse incomplète et Endocycle (8C)	?	Vague de polyploïdisation après régénération
		Macrophages	Endocycle et Endomitose	Conséquence de l'infection à <i>M.Tuberculosis</i>	

TABLE 1. LA POLYPLOÏDIE DANS LE REGNE ANIMAL ET VÉGÉTAL

Liste non exhaustive de plantes et animaux contenant des cellules polyploïdes ainsi que leur rôle. La réponse de ces cellules face à certains dommages est indiquée. Modifié de (Orr-Weaver, 2015). Sources d'après (Bluteau et al., 2009; Fox and Duronio, 2013; Geng et al., 2003; Gentric et al., 2015a; Hattori et al., 2000; Hertwich et al., 2016; Lozano et al., 2006; Raslova et al., 2007; Roeder et al., 2010; Unhavaithaya and Orr-Weaver, 2012).

2.3 La polyplôidie hépatocytaire physiologique

2.3.1 Mécanisme de polyplôidisation hépatocytaire

Le foie des mammifères est un organe physiologiquement polyplôïde (Geschwind et al., 1958). L'existence d'hépatocytes polyplôïdes a été mise en évidence en 1925 par W. Jacoby. De façon physiologique, deux vagues de polyplôidisation se produisent : la première à la transition allaitement-sevrage et la deuxième lors du vieillissement. L'émergence d'hépatocytes de différentes ploïdies est due à une modification du cycle cellulaire. Le degré de polyplôidisation varie selon les espèces, de 90% chez le rongeur adulte à 30 % chez l'Homme (Bou-Nader et al., 2019; Kudryavtsev et al., 1993; Seglen, 1997; Toyoda et al., 2006).

Dans le foie de rat, au 14^{ème} jour de vie embryonnaire (stade E.14), la majorité des hépatoblastes sont bipotents et peuvent ainsi se différencier soit en hépatocytes soit en cellules biliaires (Germain et al., 1988; Shiojiri et al., 1991). Néanmoins, au stade E.15 et jusqu'aux quatre premières semaines de vie, la plupart des hépatoblastes sont promis à un lignage hépatocytaire. Cette période coïncide également avec un sévère déclin de leur prolifération (Viola-Magni, 1972). Au cours du développement post-natal et jusqu'au 21^{ème} jour (D.21), la majorité des hépatocytes diploïdes se divisent classiquement en donnant naissance à deux cellules filles diploïdes. Après le sevrage, la proportion d'hépatocytes diploïdes diminue au profit d'hépatocytes binucléés tétraploïdes ($2 \times 2n$) et mononucléés tétraploïdes ($4n$) (Gerlyng et al., 1993; Guidotti et al., 2003b; Margall-Ducos et al., 2007; Nadal and Zajdela, 1966). Ces cellules $2 \times 2n$ peuvent par la suite effectuer un nouveau cycle de division et former deux hépatocytes tétraploïdes mononucléés ($4n$) ou un hépatocyte octoploïde binucléé ($2 \times 4n$) (Figure 7). La polyplôidisation hépatocytaire physiologique atteint un plateau à trois mois de vie chez le rongeur mais une seconde vague de polyplôidisation se produit au moment du vieillissement. Chez la souris, cette deuxième vague est associée à l'augmentation du contingent octoploïde binucléé ($2 \times 4n$), alors que chez l'Homme de 50 ans, elle est associée à une augmentation des cellules binucléées $2 \times 2n$ et mononucléées $4n$ (Kudryavtsev et al., 1993; Severin et al., 1984). A 90 ans, le foie humain est composé à 27% de cellules polyplôïdes.

Les mécanismes de la polyplôidisation hépatocytaire sont maintenant largement connus. Une étude du laboratoire a montré que la rupture du programme de cytodierèse est la conséquence d'un défaut de réorganisation du cytosquelette d'actine au niveau du plan de division lors de la transition anaphase/télophase. Les microtubules du fuseau mitotique ne

connectent par le cortex équatorial, ce qui a pour conséquence d'empêcher l'activation de la signalisation moléculaire nécessaire à la formation du sillon de division et de l'anneau contractile. Ainsi, la GTPase RhoA, acteur majeur de la cytodierèse, ne se concentre pas au niveau du plan de division et la cytodierèse n'a pas lieu (Margall-Ducos et al., 2007).

La polyploïdisation hépatocytaire se produit lors de la transition allaitement-sevrage, période associée à de nombreux changements comportementaux, hormonaux et métaboliques. L'insuline via la voie PI3K/AKT a été identifiée comme un acteur important dans la genèse des hépatocytes 2x2n. Une autre étude du laboratoire a notamment montré, chez le rat, que l'injection répétée d'insuline à la transition allaitement/sevrage augmente la population hépatocytaire tétraploïde binucléée (2x2n). A l'inverse, l'injection de streptozotocine (détruisant les cellules bêta-pancréatiques sécrétrices d'insuline) avant le sevrage, conduit à une réduction drastique du taux d'insuline circulante et est associée à une diminution de ce contingent 2x2n. La diminution d'insuline ou l'inhibition de la protéine AKT permet une correcte localisation de la protéine RhoA au niveau du plan de division et l'induction d'une cytodierèse permettant la division de la cellule (Celton-Morizur et al., 2009).

D'autres facteurs contrôlant la binucléation des hépatocytes ont également été identifiés. C'est le cas des facteurs de transcription de la famille E2F qui contrôlent des gènes clés dans la progression du cycle cellulaire. Ces facteurs se répartissent en trois groupes : Les activateurs de transcription (E2F1-E2F3), les répresseurs (E2F4-E2F6) et les atypiques (E2F7-E2F8). Ces derniers ont un niveau d'expression relativement élevé lors des sept premières semaines de vie, coïncidant avec la mise en place de la binucléation (Pandit et al., 2012). Ces facteurs répriment l'expression de gènes impliqués dans la cytodierèse, favorisant la cytodierèse incomplète. Des études utilisant des souris inactivées pour les gènes *E2f7* et *E2f8* ont montré que les hépatocytes *E2f7/E2f8^{ko}* sont diploïdes (Chen et al., 2012; Wilkinson et al., 2019). A l'inverse, l'ablation du gène *E2F1* provoque une augmentation de la polyploïdie hépatocytaire (Chen et al., 2012).

De même, certains **microARN** (miARN) sont capables de contrôler la binucléation. Les miARN sont exprimés de façon organe-dépendant et âge-dépendant. miR-122 est l'un des microARN les plus exprimés dans le foie à l'âge adulte, et inhibe des facteurs favorisant la cytodierèse comme RhoA. miR-122 favorise donc la binucléation. Sa suppression entraîne par conséquent une diminution de la polyploïdie hépatocytaire (Hsu et al., 2016a).

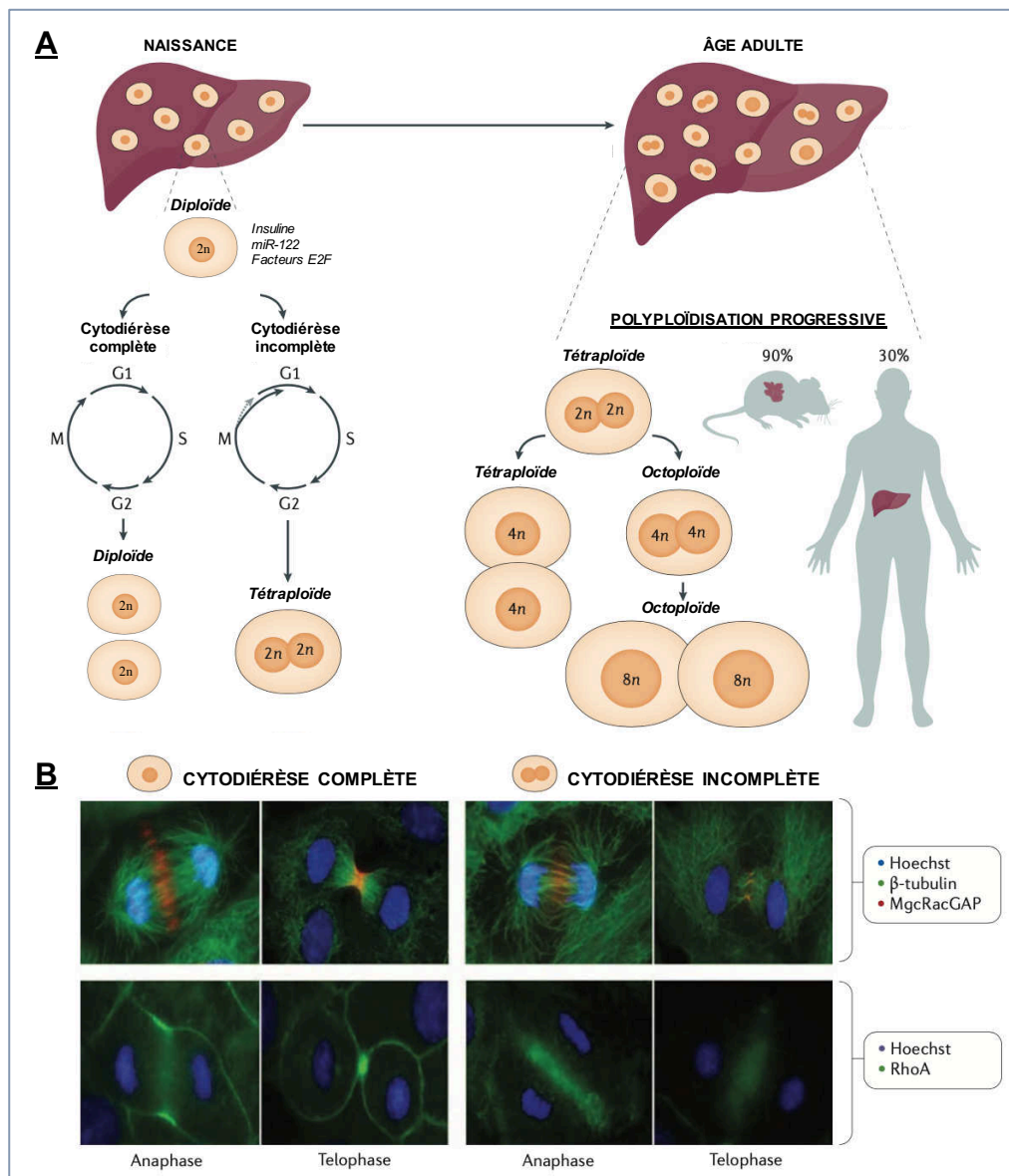


FIGURE 7. LA POLYPLÔIDISATION PHYSIOLOGIQUE DU FOIE

A. Représentation schématique des deux vagues de polyplôidisation hépatique (développement post-natal et âge adulte). Lors du développement post-natal, les hépatocytes peuvent soit se diviser de façon « normale », soit effectuer des cycles de cytotérière incomplète et donner naissance à une cellule fille tétraploïde binucléée. Cette dernière peut à nouveau rentrer dans un cycle de division et se diviser soit par cytotérière complète (naissance de deux cellules filles mononucléées tétraploïdes), soit par cytotérière incomplète (naissance d’une cellule fille binucléée octoploïde). Ainsi, ce processus peut se répéter, mais ne donnera que très rarement naissance à une cellule fille mononucléée 16n. **B.** Immunofluorescences représentant une cytotérière complète (panneau de gauche) ou incomplète (panneau de droite). Adapté de (Donne et al., 2020).

2.3.2 Conséquences et fonctions de la polyploïdisation hépatocytaire

La polyploïdisation de certaines espèces a permis leur survie sur les derniers millénaires écoulés (Van de Peer et al., 2009). Nous pouvons donc facilement imaginer que la genèse d'hépatocytes polyploïdes engendre une conséquence fonctionnelle dans le tissu hépatique.

Stade terminal de différenciation et arrêt de prolifération

Historiquement, les données de la littérature montraient que les hépatocytes polyploïdes présentaient des capacités prolifératives réduites, et étaient donc plutôt engagés dans un stade terminal de différenciation (Gerlyng et al., 1993; Kudryavtsev et al., 1993; Rajvanshi et al., 1998). De plus, ces hépatocytes polyploïdes générés lors de la deuxième vague de polyploïdisation montrent des marqueurs de sénescence associés à la présence de dommages de l'ADN ainsi qu'à l'activation de protéines inhibitrices du cycle cellulaire (p53, p21 et p16^{ink4a}) (Wang et al., 2014a). Des souris âgées de 18 mois exhibent 25% et 75% d'hépatocytes tétraploïdes et octoploïdes avec des marqueurs de dommages de l'ADN. Par ailleurs, l'ensemble des études s'accordent à dire que l'émergence de contingents de fortes ploïdies (>8n) est limitée dans le foie, suggérant ainsi un mécanisme de contrôle des niveaux de ploïdie. Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore clairement définis, p53 semble jouer un rôle clé dans cette restriction de polyploïdisation (Kurinna et al., 2013). Les travaux de Ganem et al., montrent que la cytotidérèse incomplète associée à la diminution d'activité de RhoA déclenche l'activation de la voie Hippo/Lats2/p53. Cette voie permet notamment de restreindre la prolifération des hépatocytes tétraploïdes. En effet, la suppression de p53 permet de restaurer la prolifération des hépatocytes tétraploïdes (Ganem et al., 2014). Par ailleurs, une étude a montré que le PIDDDosome (complexe Caspase-2, PIDDD et RAIDD) est activé après l'échec de cytotidérèse, et conduit à l'activation de p53 qui limite la polyploïdisation hépatocytaire (4n-8n). La suppression d'un des complexes de la voie suffit à induire une augmentation des profils de ploïdie mimant celle d'une inactivation de p53 (Fava et al., 2017). Récemment, il a été montré que c'est la présence de centrosomes surnuméraires qui est responsable de l'activation du PIDDDosome (Sladky et al., 2020).

Cependant, de nouveaux outils technologiques et de nouveaux modèles, ont permis de mettre en évidence que ces contingents polyploïdes sont capables de répondre à des stimuli de prolifération. Dans l'étude de Wang et al, bien que les populations polyploïdes témoignent de marqueurs de sénescence, après plusieurs séries de transplantations dans un modèle murin

de repeuplement, ces contingents sont capables de se diviser à nouveau pour repeupler le foie et perdent ces marqueurs de sénescence (Wang et al., 2014a). L'étude de Pandit et al., a été l'une des premières à montrer que les hépatocytes polyploïdes répondent de façon identique aux cellules diploïdes face à un événement de régénération. A l'aide du modèle murin E2F7^{-/-}/E2F8^{-/-}, dont les foies sont majoritairement constitués d'hépatocytes diploïdes, les auteurs montrent qu'après hépatectomie partielle ces foies régénèrent de façon identique à ceux de souris contrôles (constitués d'une ploïdie physiologique hépatocytaire) (Pandit et al., 2012). Ces dernières années, deux équipes américaines se sont intéressées à mieux caractériser la capacité proliférative de ces contingents. Toutes deux ont utilisé des modèles de souris dont les foies sont constitués principalement de cellules diploïdes (hépatocytes E2F7^{-/-} et/ou E2F8^{-/-}) ou de cellules polyploïdes (sevrage précoce, Anilline^{-/-}). Dans un contexte de régénération aigüe (hépatectomie partielle ou hépatotoxines), ils ont montré que les foies Anilline^{-/-} (2*2n) et E2F8^{-/-} (2n), présentent la même capacité de survie, de régénération et de prolifération que des foies contrôles physiologiquement polyploïdes (Zhang et al., 2018). L'équipe de A.Duncan confirme que les foies contrôles ou E2F7/E2F8^{-/-} diploïdes repeuplent le foie de façon identique (Wilkinson et al., 2019). Toutefois, bien que les hépatocytes diploïdes et polyploïdes répondent de façon similaire à la stimulation par des mitogènes, les hépatocytes diploïdes entrent plus précocement et progressent plus rapidement dans le cycle cellulaire que les hépatocytes polyploïdes. De façon intéressante, des différences sont également observées entre les différents contingents polyploïdes : les hépatocytes tétraploïdes entrent plus rapidement dans le cycle que les hépatocytes octoploïdes. Les auteurs suggèrent ainsi que la régulation du cycle cellulaire au sein des différentes populations cellulaires n'est pas identique (Lin et al., 2020; Wilkinson et al., 2019). Très récemment l'équipe de Markus Grompe, a confirmé ces résultats dans un modèle murin très élégant, le Rosa-Confetti, qui permet de tracer la ploïdie suite à l'expression d'un des quatre transgènes permettant l'expression d'une protéine fluorescente verte, rouge, bleue ou jaune (GFP, RFP, BLP, YFP) (Matsumoto et al., 2020). Les différents types de ploïdie peuvent être caractérisés et triés en fonction de la présence d'une seule couleur (diploïde) ou de plusieurs (polyploïde).

L'ensemble de ces études suggère que l'hépatocyte polyploïde, même s'il possède des caractéristiques de différenciation terminale est toujours capable de répondre à des stimuli mitogéniques afin de régénérer la masse hépatique.

Booster la fonction hépatique

Depuis la connaissance de la polyplôidie physiologique hépatique, de nombreuses équipes cherchent à comprendre s'il existe une conséquence sur les fonctions du parenchyme hépatique. L'une des études princeps de la caractérisation de cette polyplôidie est basée sur la génération d'un modèle murin particulier qui permet d'enrichir très fortement le foie en hépatocytes polyplôïdes par un phénomène d'endoréplication. Ce modèle permet l'inactivation du gène *Cdk1* au niveau hépatocytaire (Diril et al., 2012). Après hépatectomie partielle les hépatocytes *Cdk1*^{-/-} deviennent polyplôïdes (mononucléés 4n et 8n), et présentent une expression diminuée des gènes mitochondriaux ainsi que de la synthèse lipidique *de novo*, comparativement à des hépatocytes physiologiquement polyplôïdes. En revanche les gènes de la glycolyse sont plus fortement exprimés (Miettinen et al., 2014). Ces résultats corroborent avec des études menées à large échelle sur des tissus diploïdes et polyplôïdes murins et humains par l'équipe de A. Vinogradov. A partir de données de transcriptomique, l'étude montre que les hépatocytes polyplôïdes possèderaient des capacités accrues de certaines fonctions principalement métabolique (métabolisme de l'azote et des xénobiotiques, synthèse des protéines sanguines, maintien de la balance d'oxydo-réduction) et immunitaire (Anatskaya and Vinogradov, 2007, 2010). Ces mêmes études révèlent également que les cellules polyplôïdes présenteraient un métabolisme plutôt anaérobie, associé à la production d'ATP (Adénosine TriPhosphate) via le métabolisme des carbohydrates plutôt que de celui des acides gras.

Récemment afin de mieux caractériser ces cellules, certaines équipes se sont intéressées à savoir si elles pouvaient être localisées à des endroits particuliers du lobule hépatique, et notamment le long de l'axe porto-centrolobulaire qui présente une zonation métabolique bien définie. A partir de reconstructions spatiales de foies murins, les régions périportales et périveineuses semblent enrichies en hépatocytes tétraploïdes et présentent une faible proportion d'hépatocytes octoploïdes. *A contrario*, la région mid-lobulaire présente un enrichissement de cellules 8n et peu de cellules 4n. Les auteurs suggèrent que la mise en place de la polyplôidie hépatocytaire opère en plusieurs vagues spatiales (Morales-Navarrete et al., 2015; Tanami et al., 2017). Actuellement ces équipes utilisent des approches *in situ* innovantes qui nous permettront peut-être de définir le programme transcriptomique, métabolique et protéique de ces différentes populations cellulaires à l'échelle cellulaire.

Dans cette première partie, nous avons dans un premier temps décrit l'organisation hépatique et caractérisé les différentes populations cellulaires présentes au stade physiologique. Nous avons ensuite abordé les rôles primordiaux qu'interprète le foie dans l'homéostasie tissulaire, grâce à ses fonctions de détoxification, de synthèse et de régénération.

Le foie est également un organe polyploïde doté de différents contingents hépatocytaires polyploïdes. Bien que leurs fonctions apparaissent encore mystérieuses, ils sont de réels acteurs actifs dans l'homéostasie hépatique, et sont capables de participer à la régénération hépatique. Deux évènements de polyploïdisation se produisent au cours de la vie, au sevrage et au cours du vieillissement. L'émergence du contingent majoritaire sous la forme tétraploïde binucléée ($2 \times 2n$) est définie comme une polyploïdie physiologique. A la transition allaitement-sevrage, l'émergence de ces hépatocytes $2 \times 2n$ est sous contrôle de la voie de l'insuline.

Au regard de « l'épidémie » du syndrome métabolique, caractérisée par une stéatose hépatique associée à une perte de sensibilité de l'insuline ; l'équipe s'est alors intéressée à analyser la polyploïdie dans ce contexte.

II. La stéatose hépatique non-alcoolique – NAFLD

1 La NAFLD : une maladie chronique du foie

Les maladies chroniques du foie (CLD pour « *Chronic Liver Disease* ») regroupent un ensemble de facteurs étiologiques conduisant souvent au développement d'un cancer du foie : infections par des virus, intoxication à l'aflatoxine, consommation d'alcool prolongée, désordres métaboliques ou encore altérations génétiques et maladies auto-immunes (Figure 8). Ces facteurs contribuent à l'installation d'une inflammation chronique conduisant à un cercle vicieux de lyse-régénération induit par la mort cellulaire et une prolifération compensatoire des cellules du parenchyme hépatique. La cirrhose est l'un des stades finaux de la maladie, et résulte d'une rupture quasi-totale de l'architecture hépatique avec la formation de nodules de régénération entourés de matrice extracellulaire (collagène) conduisant souvent au développement d'un cancer du foie (Sharma and Nagalli, 2020). D'après la dernière étude épidémiologique globale de 2018, le cancer du foie représente la 6^{ème} cause de cancer et la 4^{ème} cause de cancer par mortalité (WHO, 2018).

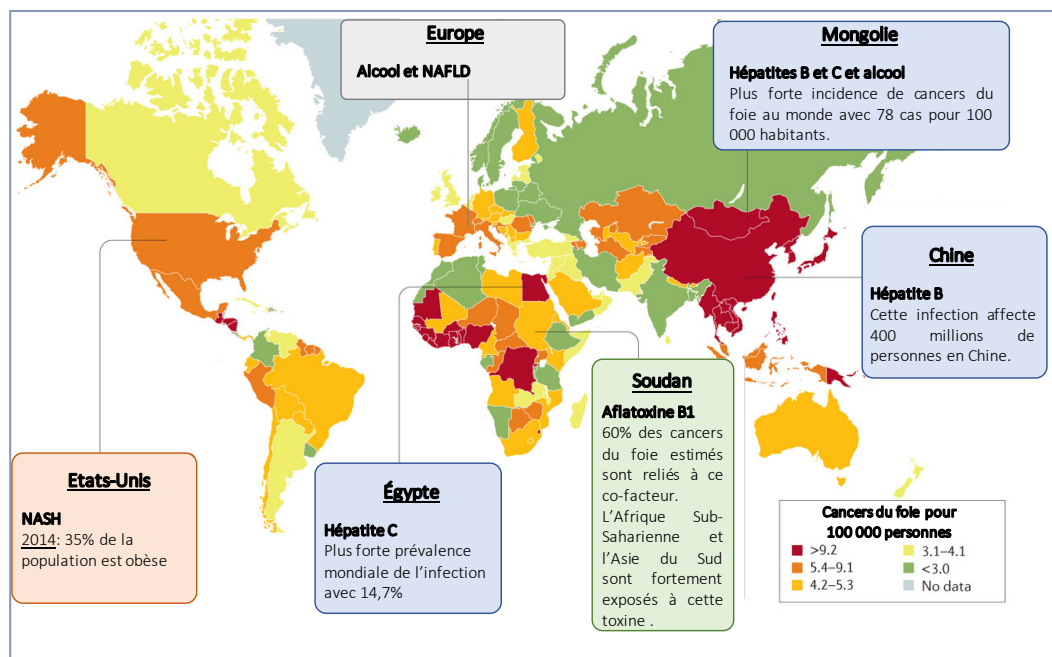


FIGURE 8. REPARTITION MONDIALE DES CANCERS DU FOIE EN FONCTION DE L'INCIDENCE

Cartographie des cancers du foie dans le monde. La correspondance du code couleur est attribuée en bas à droite de l'image. Les pays/régions situé(e)s dans les encadrés sont des zones fortement touchées par une affection hépatique caractéristique, responsable en majorité des cas de cancers hépatiques Adapté d'après (Llovet et al., 2016).

2 La stéatose hépatique non-alcoolique : présentation de la pathologie

2.1 La stéatose hépatique non-alcoolique

La stéatose hépatique non-alcoolique, ou « *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease - NAFLD* » a été décrite pour la première fois en 1980 (Ludwig et al., 1980). La stéatose est définie par l'accumulation de triglycérides (TG), sous forme de gouttelettes lipidiques, dans le cytoplasme d'au moins 5 à 10% des hépatocytes (Burt et al., 1998). Il s'agit d'une atteinte bénigne puisque le foie continue d'assurer l'ensemble de ses fonctions. D'un point de vue clinique, la NAFLD est la représentation phénotypique de troubles associés au syndrome métabolique, défini par la présence d'au moins trois des symptômes suivants : obésité abdominale, hypertriglycémie, taux sériques bas de cholestérol HDL, hypertension artérielle et glycémie plasmatique à jeun élevée. Depuis maintenant quelques années, la communauté scientifique tente de faire évoluer le terme NAFLD en MAFLD pour « **Metabolic Associated Fatty Liver Disease** », décrit comme une maladie métabolique accompagnée d'une stéatose hépatique provoquée par une surcharge pondérale, un diabète de type 2 ou des dérégulations métaboliques. Cela permet notamment d'éliminer les effets induits par les médicaments et de prendre en compte d'autres critères comme le tour de taille, la pression artérielle, les triglycérides plasmatiques, la concentration plasmatique de CRP (protéine C réactive) et le score d'insulino-résistance (HOMA) (Balmer and Dufour, 2011; Eslam et al., 2020; Tilg and Effenberger, 2020).

La NAFLD suit une séquence d'évolution dans laquelle est retrouvée une multitude d'altérations cellulaires et tissulaires (**Figure 9**). L'accumulation de lipides (stéatose) peut, après quelques années, se mouvoir dans un stade inflammatoire chronique appelé stéatohépatite ou NASH (« **Non-Alcoholic Steatohepatitis** »). Ce terrain devient alors propice à l'installation d'une fibrose, acteur conduisant à la transformation de la pathologie en cirrhose et/ou en **carcinome hépatocellulaire (CHC)**. La cirrhose se caractérise par l'accumulation de fibrose qui va délimiter des nodules hépatocytaires, détruisant ainsi l'architecture hépatique (Paradis et al., 2009).

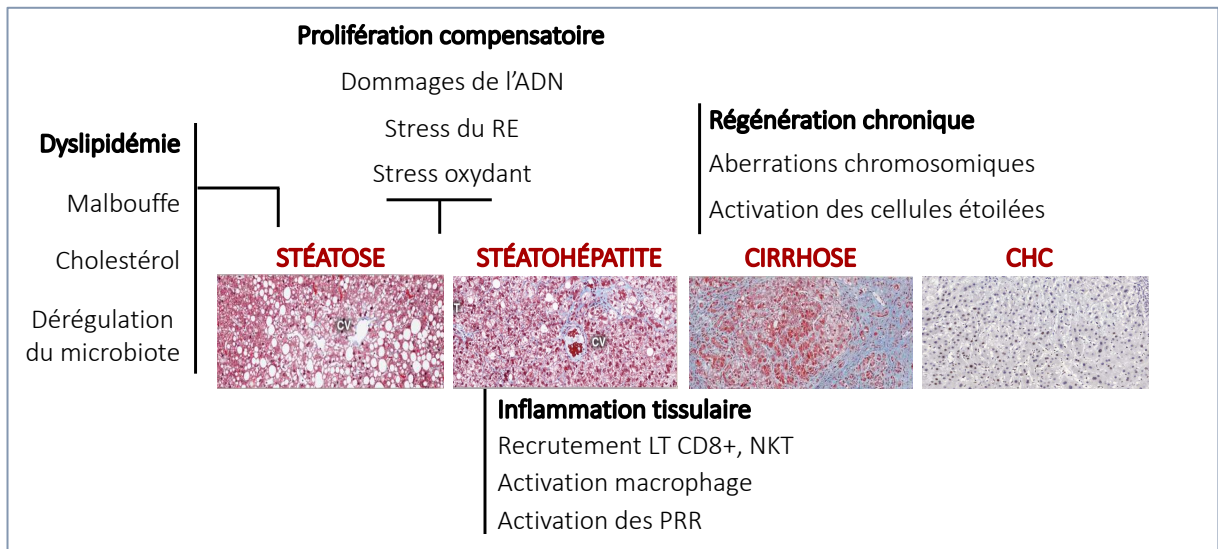


FIGURE 9. SEQUENCE D'ÉVOLUTION DE LA STÉATOSE HÉPATIQUE NON-ALCOOLIQUE

Coloration Hémalum-éosine de foie de patients aux différents stades de la maladie. Pour chaque stade, les différentes altérations moléculaires et cellulaires sont indiquées. *LT* : Lymphocyte T, *NKT* : cellules Natural Killer T, *PRR* : Pattern Recognition Receptors. Adapté de (Anstee et al., 2019; Paradis et al., 2009).

2.2 La prévalence de la NAFLD

La prévalence de la stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD), est en constante augmentation dans le monde. L'augmentation de la prévalence est plus rapide dans les pays industrialisés, et a pour cause deux phénomènes distincts : **(1)** Les traitements contre les infections des virus B et C (vaccination et thérapie, respectivement) qui diminuent les affections hépatiques induites par ces virus et donc le nombre de personnes contaminées, **(2)** La malnutrition et le manque d'activité physique. En 2020, la NAFLD sera l'indication la plus fréquente de greffe du foie aux États-Unis (Charlton et al., 2011).

Une étude épidémiologique américaine a montré qu'entre 1988 et 1994, la prévalence de la NAFLD était de 5,5 % ; qu'entre 1999 et 2004, elle était de 9,8 % ; et qu'entre 2005 et 2008, elle atteignait 11 %. Cela représente environ 60% des maladies chroniques du foie au cours de cette dernière période (Younossi et al., 2011). La prévalence de la NAFLD est actuellement estimée à 24 % de la population générale en Europe et aux États-Unis, à 27 % en Asie, à 30 % en Amérique du Sud et à 32 % au Moyen Orient. Elle est plus faible en Afrique avec 13 % (Younossi et al., 2019) (Figure 10). Dans la population mondiale générale, on estime la prévalence de la NASH entre 1,5 % et 6,45 % (Younossi et al., 2019).

En France, la prévalence de la NAFLD a été récemment estimée à partir d'une cohorte de 118 664 participants, représentative de la population française, à 16,7 % avec des variations selon les régions (allant de 10,5 % à Paris jusqu'à 23,5 % dans l'Yonne). La même étude montre que la prévalence de la Stéatohépatite (NASH), est estimée à 59,1 % chez les personnes présentant une NAFLD (Vallet-Pichard et al., 2019).

Il est important de noter que près des deux tiers des patients obèses ont une stéatose hépatique. La prévalence de la NAFLD suit une tendance similaire et parallèle à celle continue de l'obésité, dont la prévalence a doublé entre 1980 et 2014. Elle peut atteindre plus de 90 % chez les patients très obèses. En 2016, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) rapporte que 39 % des adultes (38 % des hommes et 40 % des femmes) sont en surpoids dans le monde, soit 1,9 milliard d'adultes. L'obésité atteint 13% de la population pour un total d'environ 650 millions de personnes (GBD 2015 Obesity Collaborators et al., 2017). De plus, la prévalence de la NAFLD est augmentée chez les patients atteints de diabète de type 2 et concerne 50 à 75 % des patients (Younossi et al., 2018a).

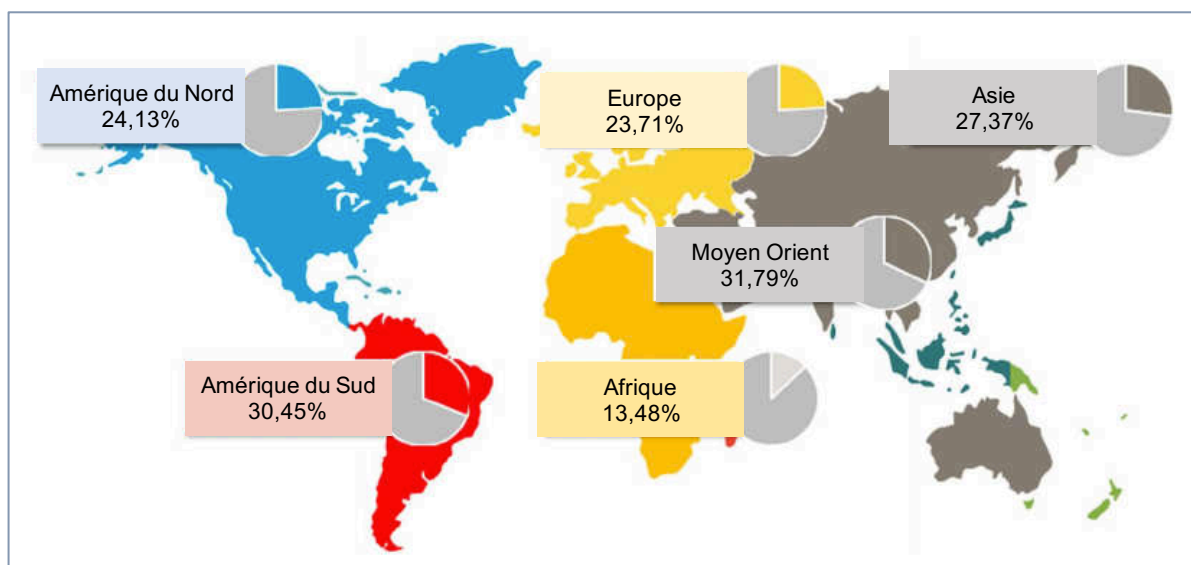


FIGURE 10. LA PREVALENCE DE LA NAFLD DANS LE MONDE

Planisphère de la prévalence de la NAFLD par zones géographiques. Adapté de (Younossi et al., 2019).

Enfin, l'étude du coût de la NAFLD par pays est intéressant. Les patients font notamment l'objet de suivis hospitaliers réguliers. Une étude française récente a montré que les patients atteints du syndrome métabolique sont hospitalisés en moyenne 3 fois par an durant sept années de suivi (Boursier et al., 2019; Vallet-Pichard et al., 2019). La NAFLD constitue donc un fléau économique mondial dont les coûts ont été estimés à 103 et 35 milliards de dollars aux États-Unis et en Europe, respectivement, avec un coût par patient entre 354 à 1163 dollars (Younossi et al., 2018b).

Si nous transformons l'ensemble de ces données en nombre annuel de morts d'ici l'horizon 2030, Estes et al, prédisent qu'environ 1,83 millions de personnes mourront des suites du développement d'une NAFLD (Estes et al., 2018).

2.3 Les modèles d'études de la NAFLD

Aujourd'hui, l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires de la NAFLD est réalisée majoritairement à l'aide de modèles murins. Les études sur l'Homme restent limitées puisqu'il s'agit d'une maladie asymptomatique, et que l'obtention d'échantillons ne peut être effectuée que par biopsie, méthode très invasive (Anstee et al., 2019; Febbraio et al., 2019; Oligschlaeger and Shiri-Sverdlov, 2020). Il existe aujourd'hui une multitude de modèles, tous ne récapitulent pas correctement la pathologie humaine et il est donc difficile de transposer les résultats sur l'Homme (Jahn et al., 2019). En effet, ces modèles précliniques doivent au mieux imiter les caractéristiques de la NAFLD et sa progression, spécifiquement d'un point de vue histologique, récapitulant l'installation de la stéatose, de l'inflammation, du *balloning* et de la fibrose. Ces critères sont mesurables par le NAFLD Activity Score (NAS), qui permet l'évaluation de 14 caractéristiques histologiques dont 4 semi-quantitatives : la stéatose (0-3), l'inflammation lobulaire (0-2), le « ballooning » hépatocytaire (0-2) et la fibrose (0-4). Les neuf autres étant répertoriés comme présent ou absent (macrophages pigmentés, mégamitochondries, etc...) (Kleiner et al., 2005).

Il existe différents types de modèles murins que nous allons développer : (Table 2)

Les modèles génétiques. Les plus populaires, ob/ob et db/db, présentent une absence d'activation de la signalisation de la leptine (gène de la leptine ou du récepteur de la leptine respectivement muté). La leptine est l'hormone de satiété sécrétée par le tissu adipeux. Son

absence de signalisation provoque l'hyperphagie des souris sous un régime « normal » et permet le développement d'une obésité associée à une stéatose, une hyperlipidémie et une insulino-résistance. Toutefois, bien que ces souris développent une stéatose, la pathologie ne progresse pas vers le stade de NASH (Hummel et al., 1966; Mayer et al., 1951). De plus, la déficience en leptine n'est pas un facteur observé chez les patients NAFLD (Uygun et al., 2000). D'autres modèles favorisent l'évolution vers les formes graves (NASH et CHC) ; notamment la délétion de facteurs impliqués dans le métabolisme (SREBP-1c transgénique, PTEN^{KO}, PPAR- α ^{KO}) mais les souris ne témoignent pas d'obésité (Febbraio et al., 2019).

Les modèles toxiques. Les modèles appelés « toxiques » comme le *Methionine-Choline-Deficient* (MCD) ou le *Choline-Deficient* (CD), sont des régimes alimentaires spécifiques engendrant un dérèglement de la balance anti-oxydante (absence de méthionine) et un blocage de l'export lipidique (absence de choline qui ne permet pas la formation des lipoprotéines de très basse densité (VLDL - Very-Low Density Lipoprotein). Le modèle MCD est par exemple capable d'induire une stéatohépatite sévère, d'un point de vu histologique, dès trois semaines de régime. Cependant, la déficience en méthionine entraîne une perte de poids des souris, qui montrent également une diminution de la glycémie associée à une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Rinella and Green, 2004; Yao and Vance, 1988). Le modèle CD est, lui aussi capable de récapituler le développement de la NASH avec une augmentation des transaminases hépatiques. Ces souris peuvent aussi présenter le développement d'une fibrose dans les 10 semaines de régime, et même le développement d'un CHC après un an (Matsumoto et al., 2013; Wolf et al., 2014). Toutefois, il est important de noter qu'il n'est jamais observé de déficience en méthionine ou choline chez les patients NAFLD.

Les modèles de régime. On retrouve aujourd'hui un grand nombre de modèles « High-Fat Diet » (HFD). Ces régimes ont l'avantage de reproduire le comportement humain : alimentation riche en graisses et sucres et apport de sucres additionnels par les sodas. Ils induisent une obésité associée à une intolérance du glucose et une insulino-résistance. D'un point de vu histologique, une stéatose apparaît dès quelques mois de régime. Cependant, la plupart de ces régimes ne provoquent pas d'inflammation et de fibrose dans une fenêtre de temps raisonnable. Il faut très souvent attendre plus d'un an avant de voir s'installer quelques

marques d'inflammation et de fibrose. Par ailleurs, il est important de noter que leur composition en nutriments peut être très différente. L'apport lipidique peut provenir d'huiles végétales ou animales et varier de 40% à 60%. Le cholestérol peut varier de 0 à 2%, et le type de sucre utilisé ainsi que sa concentration fluctuent (Jahn et al., 2019). Aujourd'hui, les principaux régimes utilisés ont un apport de 40% en graisses associé à 0-0,2% de cholestérol et le sucrose (=saccharose = glucose-fructose) est la principale source de sucres (Western Diet ou High-Fat High Sucrose - HFHS) (Verbeek et al., 2015). L'ajout de cholestérol (0,75%) dans un régime HFD permet d'induire des dommages hépatiques plus sévères avec l'installation d'une fibrose et d'une inflammation dès 16 semaines de régime (Mells et al., 2015). L'ajout de fructose entraîne une déplétion d'ATP associée à la génération d'acide urique, qui a de nombreux effets hépatiques indésirables comme l'augmentation de l'accumulation de TG (Triglycérides) et l'activation de l'inflammasome (Jensen et al., 2018). Chez l'Homme, l'apport de fructose (comparativement à du glucose) provoque l'activation de la lipogenèse *de novo* (Faeh et al., 2005), associée à l'installation d'une dysbiose intestinale et une rupture de la barrière intestinale (Bergheim et al., 2008). Ces modèles de régime semblent donc être un bon moyen de reproduire la pathologie humaine puisque en faisant varier certains paramètres, la pathologie peut évoluer vers des stades plus inflammatoires. Ainsi l'étude des transitions Stéatose/NASH et NASH/CHC est plus facile bien qu'elle soit plus longue. Toutefois, il faut garder à l'esprit que certains de ces régimes artificiels sont excessivement enrichis, et qu'il est important de maintenir une balance correcte afin de mimer au mieux le comportement occidental.

Les modèles mixtes. Le modèle CD-HFD (Choline-Deficient High-Fat Diet) permet de contrebalancer la perte de poids du modèle CD, par l'ajout d'un régime HFD. De plus, ce modèle présente l'avantage de montrer l'apparition de CHC dès 1 an de régime (Wolf et al., 2014). Le modèle toxique STAM est basé sur la destruction des cellules bêta-pancréatiques, produisant l'insuline, par la streptozotocine. Ces souris traitées à la streptozotocine puis placées sous régime HFD permet le développement d'une NASH en 7 semaines et l'évolution en CHC à 16 semaines (Fujii et al., 2013). De même, l'injection d'un carcinogène – le Diethylnitrosamine (DEN) – suivi d'une mise sous HFD permet le développement de CHC sur fond de stéatose par la production locale de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF) (Park et al., 2010a). De façon différente, le modèle DIAMOND est basé sur deux critères, l'utilisation d'une souche murine particulière (B6/129) et l'apport d'un régime Western diet (High-Fat + High Fructose), ce qui récapitule rapidement la NASH et montre une forte incidence tumorale (Asgharpour et al., 2016). Enfin, le modèle MUP-uPA + HFD est basé sur l'action de l'*urokinase plasminogen activator (uPA)* exprimée durant les six premières semaines de vie des hépatocytes. Cela induit un stress du réticulum endoplasmique et des dommages hépatiques contribuant à l'évolution vers la NASH et le CHC. Ce modèle récapitule fidèlement les altérations histologiques retrouvées dans la NASH. De plus, d'un point de vue transcriptomique, ce modèle partage certains alignements avec le profil de patients NASH alors que la plupart des autres modèles (HFD, HFHS, Western diet, MCD, STAM et PTEN) ne récapitulent pas fidèlement le transcriptome des patients NASH (Shalapour et al., 2017). Cependant l'utilisation de ces modèles reste limitée à l'étude la carcinogenèse sur NASH. Il est également important de noter que le développement des tumeurs se fait de façon extrêmement rapide et peut ne pas représenter les phénomènes moléculaires et cellulaires se produisant chez l'Homme sur les plusieurs années de développement de la pathologie.

TYPE	MODELE	Obésité	SM	IR	Stéatose	Inflam SRE	NASH	Fibrose	CHC
GENETIQUES	ob/ob ou db/db								
	PTENko								
	MUP-uPA Tg								
REGIMES	High-Fat								1% à 1 an
	Western diet (HF + cholestérol + fructose)								89% entre 8 et 13 mois
	ALIOS (High-Fat High-Fructose)								50% à 12 mois
REGIMES TOXIQUES	Methionine-Choline Deficient (MCD)								
	Choline-deficient HF								25% à 1 an
	CDAA								5% de CHC à 1 an chez les mâles
	CDAA + HFD								9% à 1 an
	DEN + HFD								100% à 9 mois
	STAM								100% à 12 semaines
GENETIQUES + REGIME	MUP-uPA + HFD								50% à 10 mois
	DIAMOND								90% à 10 mois

TABLE 2. MODELES MURINS PERMETTANT DE RECAPITULER LA NAFLD

Tableau récapitulatif des principaux modèles murins utilisés ainsi que leur capacité à présenter une obésité, un syndrome métabolique (SM), une insulino-résistance (IR), une inflammation et un stress du réticulum endoplasmique (Inflam SRE), une NASH, une fibrose et l'apparition de carcinomes hépatocellulaires (CHC). Le code couleur indique l'état de développement des différentes caractéristiques (Rouge : Forte, Orange : Moyenne, Vert : Faible). CDAA : *Choline-Deficient, L-amino-acid-defined*). Adapté d'après (Anstee et al., 2019; Febbraio et al., 2019).

Depuis quelques dizaines d'années maintenant, l'utilisation de modèles cellulaires *in vitro* et *ex vivo* devient plus courante, notamment pour les études du métabolisme et des médicaments. Cela permet de travailler sur des cellules humaines et de réduire l'expérimentation animale. Ces modèles sont multiples, ils se rangent de la simple culture cellulaire 2D exposée aux lipides et cytokines, à des modèles plus sophistiqués comme la culture en 3D telle que les co-cultures, les organoïdes et les coupes *ex vivo* issus de patients.

Culture *in vitro* de lignées cancéreuses (2D) : L'utilisation des cultures primaires d'hépatocytes peut être un moyen d'étudier certains mécanismes sur le court-terme. En effet, l'hépatocyte primaire a une durée de vie limitée de l'ordre de plusieurs jours, et montre une diminution de l'expression de certaines enzymes clés du métabolisme comme les cytochromes après 48h de culture (Boess et al., 2003). Cela n'est donc pas suffisant pour valider de potentielles cibles thérapeutiques. Ainsi, l'utilisation de lignées immortalisées (aML12) ou cancéreuses (HepG2, Huh7, Hepa1-6) peut sembler être un meilleur choix (Kanuri and Bergheim, 2013). De nombreuses études ont étudié des phénomènes métaboliques à partir de

lignées immortalisées ou cancéreuses traitées avec des combinaisons d'acides gras (généralement oléate et palmitate au ratio 2:1) (Malhi et al., 2006; Mun et al., 2019). Il est notamment montré que l'acide oléique montre des capacités stéatogéniques alors que le palmitate induit l'apoptose. La combinaison des deux au ratio 2:1 (favorable pour l'oléate), permet de contrebalancer l'apoptose et de mieux mimer les conséquences moléculaires ayant lieu dans l'hépatocyte stéatosique (Ricchi et al., 2009). Toutefois, l'utilisation de cellules cancéreuses reste une limite à l'étude de la stéatose puisque de nombreuses modifications génétiques, épigénétiques et métaboliques interviennent. Ainsi, depuis quelques années, l'utilisation des cellules HepaRG® ne cesse de croître. Ces cellules, isolées d'un patient présentant un cholangiocarcinome, possèdent des caractéristiques de cellules progénitrices hépatiques mais gardent toutes les caractéristiques moléculaires et métaboliques d'un hépatocyte différencié (Gripon et al., 2002). Grâce à ces propriétés, elles ont permis la caractérisation du métabolisme des xénobiotiques et de l'infection par le virus B (Ashraf et al., 2019; Li et al., 2020). Elles sont aujourd'hui également très demandées pour caractériser les altérations moléculaires et métaboliques se produisant dans la NAFLD. Des études de métabolomiques ont montré que l'ajout de 0,5mM d'acides gras (oléate – palmitate, ratio 2:1) induit les mêmes dérégulations métaboliques rencontrées chez le patient NAFLD, comme l'insulino-résistance, la présence d'un stress oxydant et des altérations du métabolisme mitochondrial (Brown et al., 2013; Le Guillou et al., 2018).

Culture organotypique. Il y a une dizaine d'années, les approches *ex vivo* consistaient à mettre directement en culture des échantillons tissulaires. Cela offrait la possibilité d'étudier l'action de médicaments sur une architecture hépatique entière associée aux interrelations cellulaires (Graaf et al., 2007). Cependant, ces cultures mourraient par nécrose après quelques jours d'utilisation ce qui limitait la fenêtre d'étude (Neupert et al., 2003). Ainsi, d'autres approches de cultures cellulaires ont vu le jour. De façon très simple, il a d'abord été mis en culture des hépatocytes avec des cellules non-parenchymales hépatiques, des cellules étoilées, des cellules inflammatoires résidentes et/ou des cellules endothéliales hépatiques (Riccaltón-Banks et al., 2003). Ce type de co-cultures améliore notamment les fonctions et la durée de vie des hépatocytes. Les cellules étoilées quiescentes sécrètent des mitogènes hépatiques tels que l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) et l'EGF (Epidermal Growth Factor) améliorant les fonctions hépatocytaires. Par la suite, l'évolution de ce type de co-cultures vers des approches

organotypiques a vu le jour afin de reproduire l'architecture hépatique (Dash et al., 2012). La co-culture, peut dans certains cas, remodeler une architecture 3D permettant la polarisation des hépatocytes, les interactions entre cellules et la microperfusion du tissu avec un apport en oxygène et nutriments adéquat (Lin et al., 2015). La société HemoShear a développé un système d'étude de la lipotoxicité à l'aide de cultures 3D d'hépatocytes primaires humains et de sinusoides hépatiques. Les hépatocytes sont cultivés en présence de niveaux physiologiques de glucose et d'insuline et répondent à des concentrations de traitements telles que retrouvées en clinique (Dash et al., 2013). Ce système a par la suite été adapté à l'étude de la stéatohépatite avec l'ajout de macrophages et de cellules étoilées primaires humaines ainsi que des combinaisons d'acides gras (oléate/palmitate, ratio 2:1) (Feaver et al., 2016). Afin de mimer l'architecture hépatique, les hépatocytes sont cultivés en sandwich de collagène. Les macrophages et cellules étoilées sont positionnés sur le dessus du sandwich, séparés des hépatocytes par une membrane. Les trois types cellulaires communiquent ainsi soit par contacts directs soit par des facteurs sécrétés. Après plusieurs jours de culture, les hépatocytes présentent une diminution de la réponse à l'insuline, accompagnée d'une accumulation de lipides intracellulaires, une lipotoxicité ainsi que la production de marqueurs inflammatoires et fibrogéniques (Feaver et al., 2016). L'ajout de TNF α au milieu de culture modifie le sécrétome des cellules, qui se rapproche alors de celui des patients NASH (Cole et al., 2018; Feaver et al., 2016). Ces dernières années, de nombreuses équipes de recherche essaient également de réaliser des cultures en 3D sous la forme de sphères, appelées sphéroïdes ou organoïdes (Baze et al., 2018). Cela permet de mimer réellement l'architecture hépatique, notamment en terme de polarisation cellulaire et d'interactions, puisqu'elles autorisent le mélange des différents types cellulaires (Bell et al., 2016). De façon très intéressante, la durée de vie de ces sphères est de plusieurs semaines, et l'on retrouve la formation de canalicules biliaires fonctionnels à l'intérieur ainsi qu'une expression stable de l'albumine et de la synthèse d'urée (Tostões et al., 2012). Récemment, l'étude de Kozyra et al. a réussi à reproduire un modèle de NAFLD en sphéroïdes issus d'hépatocytes primaires humains, suite à l'apport d'acides gras (oléate/palmitate, ratio 1:1), d'insuline et de sucres permettant l'accumulation lipidique sous forme de gouttelettes. Après 48h de culture, les sphéroïdes sont insulino-résistantes et les enzymes de la lipogenèse sont fortement exprimées (Kozyra et al., 2018). Par ailleurs, la société Organovo (ExVive™ Human Liver Tissue) a mis au point un modèle de bio-impression hépatique à partir d'hépatocytes primaires humains, de cellules étoilées et de cellules endothéliales. Les

différents types cellulaires sont mélangés et cultivés dans une matrice brevetée permettant de mimer très fidèlement l'architecture native du foie. Les fonctions hépatiques métaboliques correspondent à celles retrouvées dans un foie sain, et les cultures peuvent s'étendre jusqu'à quatre semaines. De façon encore plus impressionnante, l'ajout de cellules de Kupffer et l'exposition à des acides gras stéatogènes permettent la formation d'une inflammation et l'installation d'une fibrose dans les tissus bio-imprimés ([Organovo, 2018, 2019](#)).

Actuellement, de nouveaux outils technologiques offrent une alternative aux cultures cellulaires déjà existantes. La culture organotypique est capable de récapituler l'architecture hépatique ainsi que le métabolisme hépatocytaire et les interactions entre les différents types cellulaires. Bien que l'usage de ces techniques très prometteuses permet d'approfondir certains mécanismes moléculaires, il reste encore quelques verrous techniques et mécanistiques. En effet, les différentes étapes de la NAFLD ne sont pas encore correctement reproduites. De plus, il sera important dans le futur de s'assurer de la présence et l'activation du microenvironnement immunitaire, avant de pouvoir utiliser ces modèles dans le cadre de nouvelles thérapies.

3 La stéatose hépatique : une reprogrammation métabolique

La pathogenèse de la NAFLD est multifactorielle. Depuis quelques années, il est maintenant admis que la progression de la NAFLD se déroule de façon consécutive avec plusieurs altérations cellulaires et tissulaires (appelée « multiple-hits »). Jusque-là, la théorie du « two hits hypothesis » prédominait. On considérait alors que la première étape d'accumulation lipidique, associée à la lipotoxicité et induite par l'insulino-résistance, permettait l'installation de l'inflammation chronique. Celle-ci était favorisée par la présence d'un stress oxydant, la diminution d'ATP et la présence d'endotoxines. Aujourd'hui il est bien démontré que la maladie s'installe suite à un ensemble de dérégulations tissulaires et cellulaires dont la lipotoxicité est l'acteur central de la maladie. La dysbiose intestinale ainsi que la dérégulation métabolique du tissu adipeux sont des facteurs promoteurs de la dérégulation hépatique (Buzzetti et al., 2016).

Afin de mieux comprendre la pathogenèse, il sera dans un premier temps abordé certaines notions de régulations métaboliques hépatiques. Par la suite, en relation avec mes travaux de thèse, nous axerons les caractéristiques de la NAFLD sur le développement de la lipotoxicité et la mise en place du stress de certaines organelles et l'activation de l'inflammation.

3.1 Le métabolisme hépatique en condition physiologique

3.1.1 Le métabolisme en période postprandiale

Lors de cette période, les carbohydrates sont digérés au niveau tractus digestif en monosaccharides, ce qui conduit à la production de sucres simples comme le glucose. Celui-ci est alors transporté dans le sang, ce qui élève la glycémie et permet la production et la libération de l'insuline par le pancréas. Au niveau des organes, ce glucose va être converti en glucose-6-phosphate et entrer dans une voie particulière, appelée la glycolyse, permettant la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) (Han et al., 2016).

Cependant, au niveau du foie et plus particulièrement dans les hépatocytes, ces sucres en excès, vont alors pouvoir être stockés de deux façons : **(1)** Sous forme de glycogène, par la voie de glycogénèse qui permet l'empilement des glucoses entre eux, et un stockage plus facile et plus compact au sein de la cellule. **(2)** Sous forme d'acides gras, par la voie de lipogénèse *de novo*, en utilisant l'acétyl-CoA généré par la glycolyse (Figure 11A) (Han et al., 2016). Le contrôle

des enzymes de la lipogenèse s'effectue de manière transcriptionnelle. Le glucose et l'insuline en sont les principaux acteurs et induisent l'activation des facteurs de transcription ChREBP (carbohydrate response element binding protein) et SREBP1c (sterol regulatory element-binding protein 1c) respectivement (Eberlé et al., 2004; Postic and Girard, 2008; Shimano and Sato, 2017).

Dans le même temps, les lipides provenant de l'alimentation circulent sous forme de vestiges de chylomicrons jusqu'au foie. L'hydrolyse des TG issus des chylomicrons se fait par la lipoprotéine lipase et permet la libération des AG non estérifiés dans le sang. Ceux-ci se lient alors à l'albumine plasmatique, ce qui permet leur passage dans l'hépatocyte via les transporteurs FATP et CD36 (Doege and Stahl, 2006).

L'ensemble des acides gras, issus de la lipogenèse *de novo* et de l'hydrolyse des chylomicrons, sont alors inclus dans des vacuoles contenant des lipoprotéines, appelées VLDL. Elles sont ensuite sécrétées dans la circulation sanguine et permettent le stockage des lipides (et des TG) dans les tissus périphériques comme les muscles squelettique et cardiaque et le tissu adipeux (Ipsen et al., 2018). Ces particules de VLDL sont des lipoprotéines riches en TG (55%), composés phospholipidiques (18%) et cholestérol (19%) (Gibbons, 1990). Le nombre de TG par VLDL peut varier d'un VLDL à un autre (Kawano and Cohen, 2013). Elles sont formées au niveau du réticulum endoplasmique, où est incluse une apolipoprotéine B100 (ApoB100) par la MTP (Microsomal Triglyceride transfer Protein) afin de stabiliser la particule (Hussain et al., 2003). Elles transitent ensuite par l'appareil de Golgi pour être maturées puis sont exocytées. L'insuline joue un rôle important dans la régulation de l'assemblage des VLDL : (1) Elle promeut la dégradation de l'ApoB100 par un mécanisme d'autophagie, et, (2) régule négativement l'expression de MTP (Ginsberg and Fisher, 2009; Kamagate and Dong, 2008).

3.1.2 Le métabolisme en période de jeûne.

Lors de cette période, le foie a pour rôle de maintenir l'homéostasie en stabilisant le niveau de glycémie et ainsi assurer les fonctions tissulaires. Lorsque la glycémie diminue en dessous d'un certain seuil, une hormone pancréatique est sécrétée : le glucagon. C'est à partir de cette hormone qu'une cascade de signalisation va alors se mettre en place et induire la transformation du glycogène en glucose par la voie de glycolyse (Figure 11B). Cependant, lorsque cette période de jeûne perdure, le glycogène est épuisé et le foie doit trouver d'autres issues afin de maintenir cette homéostasie. Ainsi, une seconde voie se met alors en place, la

néoglucogénèse ; qui permet la production de sucres à partir de matières « non-carbohydriques » comme les acides aminés, l'acide lactique, le fructose ou encore le galactose.

Le foie est également le lieu de la β -oxydation (lipolyse). Elle se produit majoritairement dans la matrice mitochondriale ou le peroxysoxe en fonction de la taille des AG. Les triglycérides sont alors transformés en acétyl-CoA, ce qui permet la production d'ATP et de corps cétoniques ce qui est essentiel au maintien du taux de TG hépatiques (Ipsen et al., 2018).

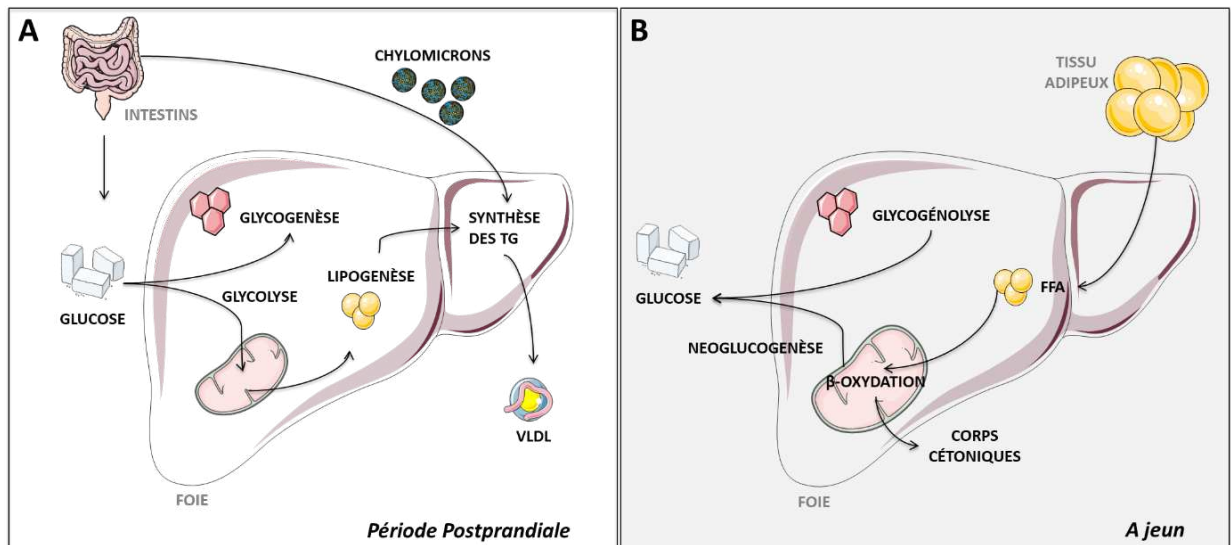


FIGURE 11. LE METABOLISME HEPATIQUE

A. En phase postprandiale, le glucose provenant de l'alimentation et donc du tractus gastro-intestinal, est stocké dans le foie sous forme de glycogène. Le glucose, via la glycolyse est aussi utilisé pour la synthèse des acides gras via la lipogénèse *de novo*. Les acides gras ingérés par l'alimentation sont véhiculés au foie sous la forme de vestiges de chylomicrons. Les acides gras sont alors estérifiés en triglycérides, puis exportés vers les tissus périphériques par l'intermédiaire des VLDL. **B.** Lors du jeûne, le foie libère du glucose à partir des stocks de glycogène (glycogénolyse). La lipolyse du tissu adipeux fournit des acides gras qui seront oxydés par β -oxydation. Cela permet de générer des substrats nécessaires pour la néoglucogénèse et la formation de corps cétoniques.

3.2 Dérégulations métaboliques lors de la stéatose hépatique

L'accumulation de lipides intra-hépatiques chez les patients NAFLD se présente majoritairement sous forme de triglycérides, qui sont issus de l'estérification d'une molécule de glycérol et de trois molécules d'acides gras (AG). Les TG sont ensuite stockés dans des gouttelettes lipidiques et entourés de protéines structurales comme les périlipines, régulant les mécanismes de stockage (Fujii et al., 2009). Il semblerait que l'accumulation sous forme de TG soit un mécanisme de protection qui empêcherait la production de lipides toxiques. Par exemple, l'inhibition de l'enzyme DGAT2 (Diacylglycerol acyltransferase 2), impliquée dans la formation de TG, provoque la réduction de TG intrahépatiques et empire la NASH, dans le modèle murin MCD (Yamaguchi et al., 2007).

Chez les patients NAFLD, l'accumulation des TG hépatiques est due à 60% à l'absorption des AG non estérifiés de la circulation, 27% à la lipogenèse *de novo* et 15% à l'alimentation (Donnelly et al., 2005). Les causes de cette accumulation lipidique reflètent donc le déséquilibre entre réception, synthèse et export lipidique. L'identification de signatures lipidiques spécifiques à partir de biomarqueurs sériques pourra bientôt permettre de définir l'installation d'une stéatose simple ou l'évolution vers la NASH (Alonso et al., 2017).

3.2.1 L'absorption des acides gras

Le transport des acides gras est assuré par un panel de transporteurs allant des FATP transporteurs à CD36. Dans des modèles murins d'obésité, la délétion de FATP2 ou FATP5 permet de diminuer considérablement la surcharge en lipides et de surcroît la stéatose hépatique, indiquant un rôle de ces transporteurs dans l'installation de la pathologie (Doerge et al., 2006, 2008; Falcon et al., 2010). Chez l'Homme, des études contradictoires ont été publiées concernant le rôle de ces transporteurs (Westerbacka et al., 2007; Zhu et al., 2011). Cependant, il est clairement démontré que le récepteur CD36 joue un rôle causal dans l'installation de la maladie. Chez la souris, sa surexpression induite par l'intermédiaire d'un adénovirus permet d'augmenter l'apport et l'accumulation lipidique, alors que sa suppression dans des modèles d'obésité génétique ou nutritionnellement-induite, diminue la stéatose (Koonen et al., 2007; Wilson et al., 2016). Chez l'Homme, il a été rapporté que les niveaux de transcrits de CD36 sont augmentés chez les personnes obèses (Greco et al., 2008) et les patients NAFL et NASH comparativement à des sujets contrôles (Miquilena-Colina et al., 2011). D'un point de vue

histochimique, cette même étude a montré que les patients NAFL/NASH présentent une localisation de CD36 à la membrane, alors qu'elle est majoritairement cytoplasmique dans des hépatocytes humains sains, suggérant une translocation à la membrane de CD36 dans la pathologie. Par ailleurs, des dérégulations de la protéine FABP1 ont été montrées dans la pathologie. Il s'agit d'une protéine impliquée dans le transport, le stockage et l'utilisation des AG exerçant une activité anti-lipotoxique de par sa fixation possible aux AG libres cytotoxiques. En les fixant, elle permet leur oxydation puis leur incorporation à des TG, afin de les stabiliser (Wang et al., 2015). De façon intéressante, l'expression de FABP1 est augmentée chez le patient obèse stéatosique et pourrait ainsi jouer un rôle tampon de la lipotoxicité, d'autant plus qu'elle est retrouvée fortement diminuée dans la NASH, stade pathologique marqué par un fort niveau de lipotoxicité endommageant les organelles (Charlton et al., 2009).

3.2.2 La synthèse de novo.

Des études utilisant des isotopes stables ont permis de montrer que les patients NAFLD présentent une lipogenèse *de novo* (LDN) anormalement élevée lors de la période postprandiale, et sont par conséquent incapables de réguler la LDN lors des stades de transitions nutritionnels (Diraison et al., 2003; Lambert et al., 2014). Comme nous l'avons vu, la LDN est régulée par deux facteurs de transcription : SREBP1c, qui est activé par l'insuline et LXR α ; et ChREBP, qui est activé par les carbohydrates. L'expression de SREBP1c est retrouvée plus élevée chez les patients NAFLD (Kohjima et al., 2007) ; et les souris surexprimant ce facteur présentent des niveaux de TG hépatiques plus élevés (Shimano et al., 1997). De plus, l'augmentation des niveaux de SREBP1c corrèle avec l'augmentation d'expression de ces cibles en aval, aussi bien dans des modèles murins de stéatose que chez des patients NAFLD (Perfield et al., 2013; Postic and Girard, 2008; Xie et al., 2010). Par ailleurs, la délétion de ChREBP chez des souris réduit la LDN de 65% mais promeut également une insulino-résistance, et induit une sévère intolérance vis-à-vis des carbohydrates, de part une forte diminution de la glycolyse (Iizuka et al., 2004). Cependant, le ciblage des deux facteurs, SREBP1c ou ChREBP, provoque également une augmentation du métabolisme du cholestérol pouvant aggraver la pathologie. Notamment la suppression de SREBP1c provoque une compensation par le facteur SREBP2, acteur principal dans le métabolisme du cholestérol. Cibler ces deux acteurs d'un point de vue thérapeutique semble donc difficile (Ipsen et al., 2018).

3.2.3 L'export des lipides.

Comme nous l'avons vu, la sécrétion des VLDL est le seul moyen d'exporter les lipides dans le sang. Chez des patients mutés pour les gènes codant les protéines ApoB100 (hypobétalipoprotéïnémie) (Tanoli et al., 2004) ou MTP (abétalipoprotéïnémie) (Berriot-Varoqueaux et al., 2000), la formation de VLDL n'a pas lieu, et une accumulation de TG se produit, ce qui amène au développement d'une stéatose hépatique. Ces observations ont été confirmées dans des modèles murins présentant une délétion du gène *Mtp*. A l'inverse, des souris présentant une surexpression de *MTP* au niveau hépatique montrent une surproduction de VLDL et une augmentation des niveaux plasmatiques de TG (Raabe et al., 1999; Tietge et al., 1999). De façon surprenante, une surproduction de VLDL est observée chez les patients NAFLD, qui s'explique par l'augmentation de la lipogenèse *de novo* ainsi que de la lipolyse hépatique et adipocytaire (Fabbrini et al., 2008). De plus, l'assemblage des VLDL est augmentée de part **(1)** la disponibilité lipidique, et **(2)** l'incapacité de l'insuline à stopper la production des VLDL. Dans ce cas, l'ApoB100 n'est pas dégradée et l'expression de MTP n'est pas jugulée. Toutefois, cette surproduction de VLDL ne semble pas due à une augmentation du nombre de VLDL, mais plutôt par la sécrétion de VLDL contenant plus de TG (Choi and Ginsberg, 2011). *A contrario*, d'autres études ont montré que les niveaux d'expression de MTP ou de l'ApoB100 sont identiques entre des patients NAFLD et sains (Nagaya et al., 2010) voire même diminués (Charlton et al., 2002).

3.3 Les acteurs de la pathogenèse

3.3.1 La lipotoxicité

La lipotoxicité se définit comme une dérégulation de l'environnement lipidique et/ou de la composition en lipides intracellulaires entraînant l'accumulation de composés lipidiques toxiques pour la cellule. Ceux-ci peuvent induire une défaillance des organelles, des dommages cellulaires pouvant même aller jusqu'à la mort cellulaire. La lipotoxicité est associée à une inflammation chronique et prédispose au développement d'un syndrome métabolique (Marra and Svegliati-Baroni, 2018). Celle-ci conduit à la genèse d'un stress oxydant et d'un stress du réticulum endoplasmique, responsable de l'activation de réponses inflammatoires. Les dommages hépatocellulaires déclenchent la mort des hépatocytes qui libèrent alors des molécules pro-inflammatoires capables d'activer les cellules immunitaires et les cellules étoilées pro-fibrosantes (Figure 12) (Parthasarathy et al., 2020).

Les **acides gras** (AG) sont constitués d'une fonction acide carboxylique et d'une chaîne carbonée dont le nombre de carbone (C) définit leur longueur. On distingue les AG à chaîne courte ($C < 8$), à chaîne moyenne ($8 < C < 16$) et à chaîne longue ($C > 16$). Ils sont divisés à nouveau en fonction de la présence ou non de double liaisons entre les atomes de carbone, définissant ainsi l'état de saturation de l'acide : les AG saturés (pas de doubles liaisons), les AG mono-insaturés (une double liaison) et les AG polyinsaturés (plusieurs doubles liaisons) (N.Marieb, 2010). Le palmitate (C16:0) est un AG à longue chaîne fortement retrouvé dans le foie lors de la NAFLD, et est notamment identifié comme toxique pour l'hépatocyte (Hirsova et al., 2016). Des expériences réalisées sur la lignée cellulaire cancéreuse HepG2, montrent que le traitement par du palmitate induit l'apoptose des cellules, tandis qu'un traitement par de l'oléate (C18:1) promeut l'estérification sous forme de triglycérides (Ricchi et al., 2009). De façon intéressante, le traitement de souris avec un régime MCD et de l'oléate permet de prévenir l'apparition de la fibrose et de l'inflammation, suggérant des propriétés protectrices de l'oléate (Lee et al., 2011). Bien qu'il soit rapporté que les AG mono- et polyinsaturés sont les moins toxiques, ils contribuent tout de même au développement de la stéatose (Mato et al., 2019). L'accumulation lipidique n'est donc pas toujours synonyme de lipotoxicité.

Le cholestérol apparaît également comme un acteur important de la lipotoxicité, notamment sous sa forme non estérifiée (libre). Sa présence dans les membranes mitochondriales favorise l'installation d'un stress oxydant en perturbant le potentiel membranaire et en réduisant le niveau de glutathion mitochondrial (Marí et al., 2006). De plus, il a été montré l'existence d'une corrélation positive entre accumulation de cette forme libre de cholestérol et aggravation de la NASH (Savard et al., 2013). Dans cette étude, des souris placées sous régime HFD + 1% de cholestérol (High-Fat High-Cholesterol – HFHC) présentent une stéatose hépatique et une inflammation plus importantes que les souris placées sous HFD sans cholestérol. De plus, les souris HFHC témoignent de la présence de fibrose périsinoïdale associée à une inflammation du tissu adipeux. Le cholestérol libre peut s'agglomérer et former des cristaux au sein des gouttelettes lipidiques (Mashek et al., 2015), pouvant activer une réponse pro-inflammatoire induite par l'inflammasome NLRP3 et le recrutement des cellules de Kupffer productrices de TNF- α (Ioannou et al., 2013). Enfin, l'administration de médicaments hypocholestérolémiant dans un modèle de souris placées sous régimes HFHC, permet de diminuer la formation des cristaux, et est associée à une réduction de la réponse

inflammatoire (Ioannou et al., 2015). Ces résultats montrent donc que le cholestérol libre est un activateur de la réponse pro-inflammatoire dans la NASH.

Les céramides jouent également un rôle important dans la mise en place de la lipotoxicité. Ce sont en fait des précurseurs de sphingolipides essentiels pour la composition des membranes plasmiques et des organelles. Ils régulent aussi la signalisation de l'insuline par l'activation des protéines en aval du récepteur. L'inhibition de la synthèse de céramides à l'aide d'un dérivé de la vitamine A – le fenretinide – chez des souris sous régime HFD permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline et améliore la stéatose (Bikman et al., 2012).

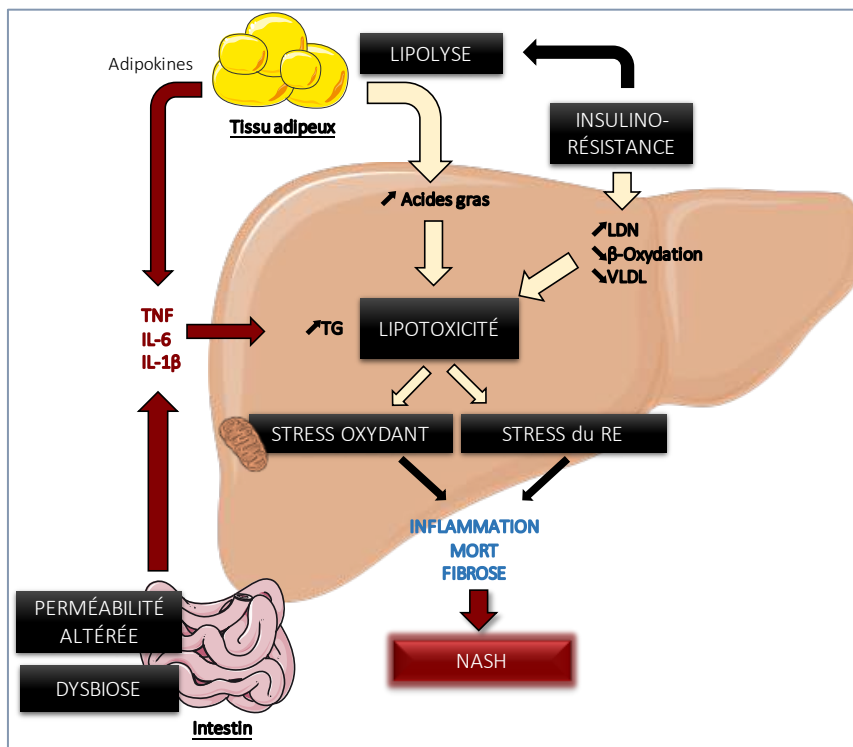


FIGURE 12. DEREGULATIONS METABOLIQUES LORS DE LA STEATOSE

Illustration de l'hypothèse du « multiple-hits ». L'obésité et les facteurs génétiques induisent une élévation des acides gras plasmatiques qui s'accumulent dans le foie. Ceux-ci ont pour effet de promouvoir l'insulino-résistance, qui va amplifier le phénomène en promouvant la lipogénèse *de novo* (LDN) et diminuer l'oxydation des AG et la dynamique des VLDL au niveau du foie. De plus, l'insulino-résistance périphérique entraîne une lipolyse du tissu adipeux qui va augmenter l'apport d'AG. La dysbiose et la perméabilité intestinale ainsi que les adipokines conduisent à la production de cytokines pro-inflammatoires. Cet ensemble (accumulation des AG et inflammation) conduit à une lipotoxicité chronique. En parallèle, le changement de métabolisation entraîne un stress oxydant et la production de ROS (Reactive Oxygene Species) ainsi qu'un stress du RE. Ces facteurs conduisent à l'évolution de la maladie. Adapté d'après (Buzzetti et al., 2016).

3.3.2 Dysfonctions mitochondriales et Stress oxydant.

La mitochondrie exerce un rôle essentiel dans le métabolisme hépatique. Elle permet notamment la production d'énergie sous forme d'ATP et, est la centrale respiratoire de la cellule. En respirant, elle génère de façon physiologique des espèces réactives de l'oxygène (ERO – ROS pour *Reactive Oxygen Species*), qui participent alors à de nombreuses fonctions cellulaires (prolifération induite par des facteurs de croissance, maintien de la barrière intestinale par renouvellement des cellules souches, stimulation et prolifération des lymphocytes T, etc...) (Holmström and Finkel, 2014). Cependant, lorsque la balance est dérégulée, l'accumulation de ces ROS devient délétère et peut avoir de nombreuses conséquences cellulaires : Cassures et mutations de l'ADN, peroxydation lipidique (oxydation des lipides insaturés) et inactivation protéique. Ces événements peuvent aller jusqu'au déclenchement de la mort cellulaire ou la transformation cellulaire (Ray et al., 2012).

Lors de la NAFLD, il est maintenant largement rapporté que des altérations structurales et fonctionnelles affectant les mitochondries se produisent chez le patient. Une déplétion d'ADN mitochondrial ainsi que des altérations de la chaîne respiratoire et de la β -oxydation se produisent (Sanyal et al., 2001). De plus, la biogenèse des mitochondries est diminuée chez le patient NASH et les mitochondries endommagées ne sont pas dégradées par l'autophagie (Koliaki et al., 2015) (Figure 13A).

Dans un premier temps, l'accumulation lipidique induit une augmentation de l'activité mitochondriale afin de contrer l'accumulation d'AG libres. Cependant cette adaptation fonctionnelle n'est pas suffisante. Dans un modèle murin de NAFLD induit par une déficience en choline, il a été montré que la capacité de la phosphorylation oxydative est augmentée jusqu'à 12 semaines puis est perdue à 16 semaines (Teodoro et al., 2008). A ce stade la mitochondrie présente des altérations dans les complexes de respiration, dans son potentiel et sa perméabilité membranaire et enfin montre une réduction de synthèse d'ATP. Cela conduit à la production de ROS capables d'attaquer les macromolécules comme les acides nucléiques et les organites (Begriche et al., 2013; Holmström and Finkel, 2014). De plus, dans d'autres modèles murins de NAFLD ainsi que des biopsies de patients, il a été montré que la quantité des enzymes du système antioxydant est diminuée (glutathion, superoxide dismutase, etc...), ce qui crée un cercle vicieux dans lequel la production de ROS conduit à une déstabilisation de la balance anti-oxydante, qui favorise davantage l'accumulation de ROS (Figure 13B) (Liu et al., 2015). L'ADN mitochondrial, de par sa proximité avec les sites de production des ROS mais aussi

par son manque de systèmes de réparation, est très sensible aux ROS (Simões et al., 2018). Les patients NASH présentent de ce fait une augmentation des dommages oxydatifs (8-oxoguanosine) de l'ADN mitochondrial mais également nucléaire (Tanaka et al., 2013).

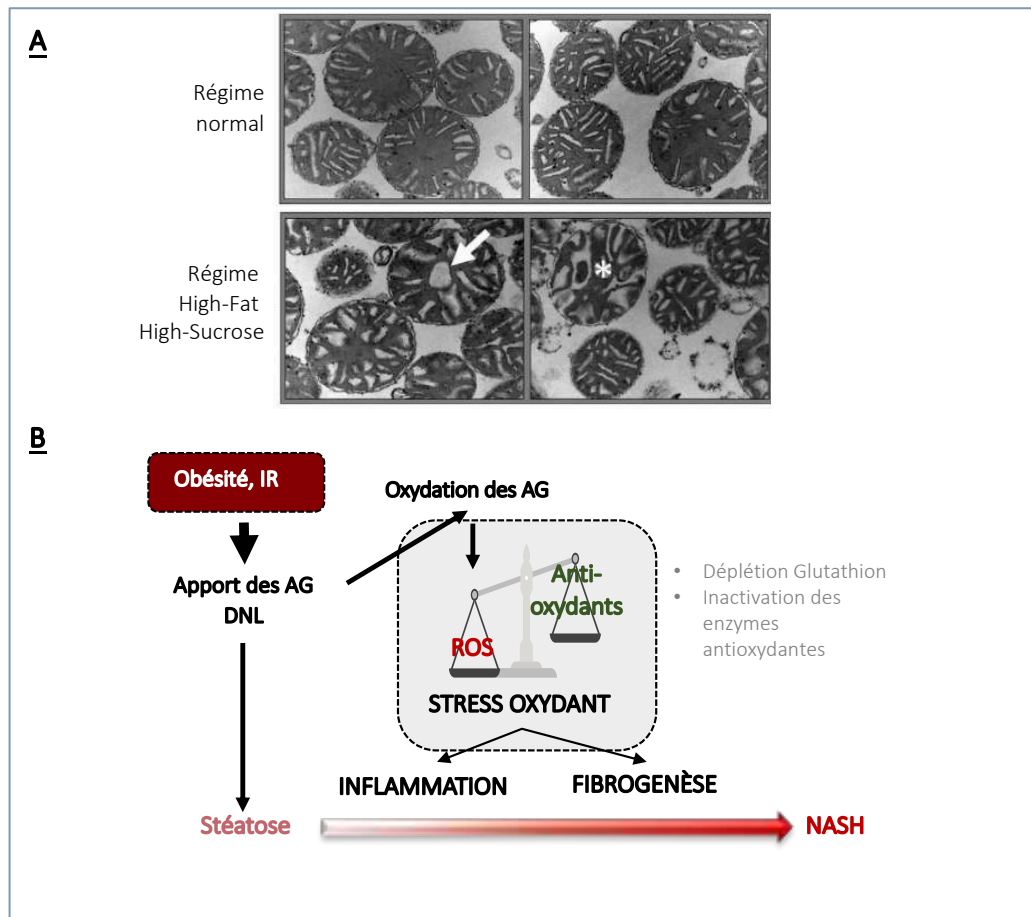


FIGURE 13. PRESENCE D'UN STRESS OXYDANT LORS DE LA NAFLD

A. Microscopie électronique de mitochondries isolées de souris contrôles ou nourries avec un régime High-Fat High-Sucrose (HFHS) pendant 24 semaines. La flèche et l'étoile montrent des mitochondries gonflées et des structures condensées, respectivement (Einer et al., 2018). **B.** Schéma illustrant le mécanisme conduisant au stress oxydant. IR : Insulino-résistance, AG : Acides Gras, LDN : Lipogenèse de novo, ROS : Espèces réactives de l'oxygène.

Par ailleurs, chez des souris NAFLD soumises à un régime High-Fat Diet, l'ADN mitochondrial est libéré dans le cytoplasme ce qui conduit à l'activation du TLR9 et à l'activation d'une voie pro-inflammatoire (Garcia-Martinez et al., 2016). Le stress oxydant est également capable d'activer la voie NF- κ B permettant la libération de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8, contribuant ainsi à l'état de nécro-inflammation hépatocytaire (Buzzetti et al., 2016). Enfin, les ROS peuvent également attaquer les lipides de la membrane mitochondriale et induire la libération du cytochrome C dans le cytoplasme conduisant à une mort par apoptose intrinsèque (Kagan et al., 2005).

Par ailleurs, le stress oxydant agit de façon concomitante avec le stress du réticulum endoplasmique dans l'établissement de la pathologie. Notamment, le premier est capable d'induire le deuxième qui, dans un deuxième temps, stimulera la production de vacuoles lipidiques et amplifiera le stress oxydant. Cette action induira ainsi une évolution de la pathologie vers le stade de NASH (Ghemrawi et al., 2018).

3.3.3 Stress du Réticulum Endoplasmique (RE)

De façon générale, l'induction d'un stress du RE se traduit par l'activation de la voie des UPR (Unfolded Protein Response), qui se décompose en trois senseurs de stress transmembranaires (1) l'inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), (2) la PKR-like ER kinase (PERK) et (3) l'activating transcription factor 6 (ATF6) (Figure 14A). Il est important de comprendre que la majorité du métabolisme lipidique hépatocytaire est en lien étroit avec le réticulum endoplasmique : La lipogenèse *de novo* (LDN) est régulée par SREBP1c qui est localisé dans la membrane du RE ; les TG sont formés grâce à des acyltransférases (comme la DGAT) qui se trouvent également dans le RE ; les VLDL sont assemblés dans le RE avant d'être envoyés dans l'appareil de Golgi. L'homéostasie du RE est donc cruciale pour maintenir la composition lipidique des membranes mais aussi pour contrôler les niveaux de lipides intrahépatiques et plasmatiques (Lebeaupin et al., 2018).

L'activation de la voie des UPR a été observée chez des patients NASH obèses, ainsi que dans de nombreux modèles murins de NASH et est présent dans plusieurs types cellulaires et tissus (Figure 14B) (Lebeaupin et al., 2018; Puri et al., 2008). L'utilisation de modèles murins a permis de déterminer que les trois régulateurs de l'UPR sont impliqués dans le développement de la stéatose en maintenant la LDN, la lipolyse et en réduisant l'oxydation des AG ainsi qu'en perturbant la sécrétion des VLDL. (1) L'axe IRE1a-XBP1 est un régulateur positif de la sécrétion

de VLDL et de la lipogenèse. L'inhibition d'IRE1 (par la surexpression de son inhibiteur BI-1 : Bax Inhibitor 1) promeut la diminution d'expression des enzymes clés de la lipogenèse (C/EBPa, SREBF1, PGC1a) (Bailly-Maitre et al., 2010). De même, la délétion conditionnelle de XBP1 dans les hépatocytes diminue la LDN, l'accumulation de TG et de cholestérol plasmatiques et diminue la stéatose en réponse à des régimes lipogéniques (Lee et al., 2008). (2) L'axe **PERK-eIF2a-ATF4** est un régulateur de la lipogenèse. Par exemple, la déficience du facteur ATF4 protège les souris de l'installation d'une stéatose malgré un régime HFD, en atténuant la LDN (Xiao et al., 2013). (3) A l'inverse, le régulateur **ATF6**, une fois activé, semble protéger de la stéatose. Il interagit notamment avec PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) afin d'augmenter son activité transcriptionnelle, et ainsi augmenter l'oxydation des AG. La surexpression de la forme active d'ATF6 protège de l'installation de la stéatose dans un modèle murin de régime induisant une insulino-résistance (Chen et al., 2016b).

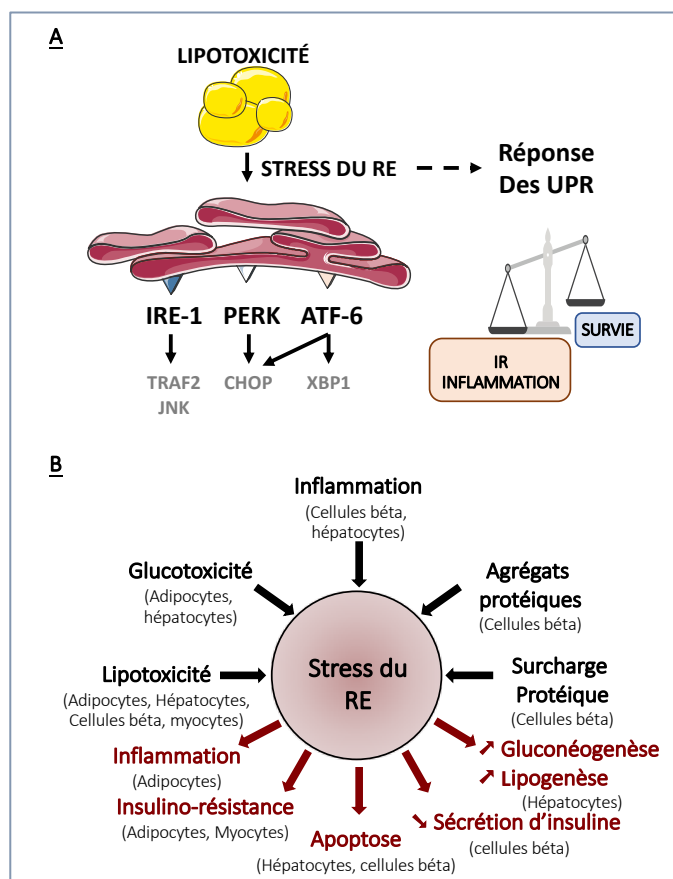


FIGURE 14. LE STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE DANS LA NAFLD

A. Mécanisme et acteurs de la voie des UPR. IR : Insulino-résistance. Adapté de (Lebeaupin et al., 2018).

B. Localisation, causes et conséquences du stress du RE dans la NAFLD.

3.3.4 Signaux pro-inflammatoires

L'ensemble des dérégulations métaboliques mais également le stress du RE peuvent conduire à l'établissement d'une inflammation, notamment suite à l'activation des voies de signalisation JNK et NF- κ B (Ribeiro et al., 2004). L'activation de NF- κ B est cruciale dans l'induction des réponses inflammatoires et permet dans un premier temps de maintenir la survie cellulaire. Cependant, lorsque la NASH est installée, il s'agit d'une arme à double tranchant qui promeut également des lésions hépatiques, la fibrose et la progression vers le carcinome hépatocellulaire (Luedde and Schwabe, 2011). De nombreuses études supportent l'idée que NF- κ B aurait un rôle important dans la carcinogène induite dans un contexte d'obésité, notamment associée à l'IL-6 et au TNF α , dont l'expression est considérablement augmentée chez les patients obèses (Szabo and Petrasek, 2015).

De façon surprenante, la surexpression hépatocytaire de IKK- β dans un modèle murin, conduit à la sur-activation de NF- κ B qui promeut alors une inflammation chronique et la mise en place d'une insulino-résistance (Cai et al., 2005). Il est maintenant largement établi que les patients NASH présentent une inflammation qui corrèle avec des sévérités histologiques avérés (Patouraux et al., 2017).

3.3.5 Activation de l'inflammasome

L'inflammasome est un complexe multiprotéique cytoplasmique qui consiste en un groupement de caspases et de molécules de reconnaissances de dérivés de pathogènes ou de cellules lésées. Son activation déclenche un programme pro-inflammatoire. Les PAMPs (**p**athogen-**a**ssociated **m**olecular **p**attern) endogènes ou exogènes et les DAMPs (**d**amage-**a**ssociated **m**olecular **p**attern) sont des molécules capables de lier des régulateurs pro-inflammatoires particuliers appelés PRR (**p**attern **r**ecognition **r**eceptors) comme les TLR (**T**oll-**l**ike **R**eceptors), NLR (**N**od-**l**ike **r**eceptors) ou encore les CLR (**C**-**t**ype **l**ectin **r**eceptors) (Buzzetti et al., 2016).

En plus des signaux microbiens ou viraux, le foie peut être exposé à des stimuli dérivés de l'hôte, comme la libération de DAMPs cellulaires dans le tissu : C'est ce qu'on appelle l'inflammation stérile. Les DAMPs les plus retrouvés dans le foie agressé sont l'ATP, l'acide urique, les cristaux de cholestérol, les ROS et l'ADN cytosolique. Cet ensemble conduit à l'activation de l'inflammasome formé de la sérine protéase Caspase 1 et aboutit à la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 (Figure 15A). Il existe 3 protéines principales formant le cœur de

l'inflammasome : NLRP3, AIM2 et NLRP6 (Szabo and Petrasek, 2015). L'inflammasome NLRP3 (NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3) est celui le plus étudié dans le foie. Il est activé chez des patients atteints de syndrome métabolique, et associé à la production d'IL-1 β (Vandanmagsar et al., 2011). De façon étonnante, plusieurs études basées sur des modèles murins, montrent que l'inflammasome hépatique n'est activé qu'au stade de NASH. Les modèles de stéatoses ne présentent qu'une légère augmentation de l'expression des gènes des composants de l'inflammasome NLRP3 (*Nlrp3*, *Asc* et *Casp1*) sans montrer d'activation protéique (clivage de la caspase 1), à l'inverse des modèles de NASH (MCD et HFD) (Csak et al., 2011a). Dans la NASH, l'inflammasome est présent au niveau des cellules immunitaires et des cellules parenchymales comme les hépatocytes. Notamment, la saturation d'hépatocytes murins en culture avec de l'acide palmitique augmente l'expression et active l'inflammasome jusqu'à la production de l'IL-1 β (Csak et al., 2011a). La déficience de NLRP3 dans un modèle murin de NASH (CDAA) provoque une diminution de la mort hépatocytaire, de l'inflammation et de fibrose (Wree et al., 2014a). Les cellules de Kupffer montrent également une activation de l'inflammasome dans la NASH, conduisant à une forte production d'IL-1 β . Leurs suppressions à l'aide de clodronate améliorent la NASH en augmentant l'expression de gènes impliqués dans l'oxydation des AG dont PPAR α (Stienstra et al., 2010). De plus, l'inflammasome joue également un rôle dans l'installation de la fibrose, en étant activé dans les cellules étoilées, notamment par la présence de cristaux d'acide urique (Watanabe et al., 2009). De plus, la déficience en Caspase 1 ou NLRP3 dans un modèle de NASH (MCD) conduit à l'amélioration de la fibrose (Dixon et al., 2013; Wree et al., 2014b) (Figure 15B).

Par ailleurs, l'inflammasome est retrouvé activé au niveau des cellules épithéliales intestinales lors de la NAFLD et a pour conséquence de moduler le microbiote intestinal. En effet, une étude a montré que la composition microbienne du tractus intestinal est changée chez des souris déficientes en NLRP3 et NLRP6, avec une balance favorable pour le genre *Prevotellaceae* (Heno-Mejia et al., 2012). Ce genre se retrouve notamment augmenté dans un modèle de NASH (MCD) et leur abondance est associée à une délivrance augmentée au niveau du foie de Lipopolysaccharide (LPS - constituant de la paroi des bactéries à Gram négatif) qui provoque une inflammation hépatique exacerbée (Mehal, 2013). Lors de la NAFLD, la barrière intestinale est altérée et prédispose à l'inflammation hépatique et au développement de la NASH (Rahman et al., 2016). Les PAMPs bactériens, comme le LPS, se retrouvent alors dans la circulation sanguine des patients NASH (Farhadi et al., 2008). Ces toxines induisent une réponse

inflammatoire hépatique par l'activation des cellules inflammatoires (Csak et al., 2011b). De façon intéressante, la déficience en TLR2, TLR4, TLR9 ou MYD88 atténue la NASH, notamment parce que le LPS arrivant directement depuis le tractus intestinal n'est plus reconnu. Le LPS joue un grand rôle dans l'activation inflammatoire lors de la NAFLD (Csak et al., 2011b; Miura et al., 2010; Wu et al., 2020).

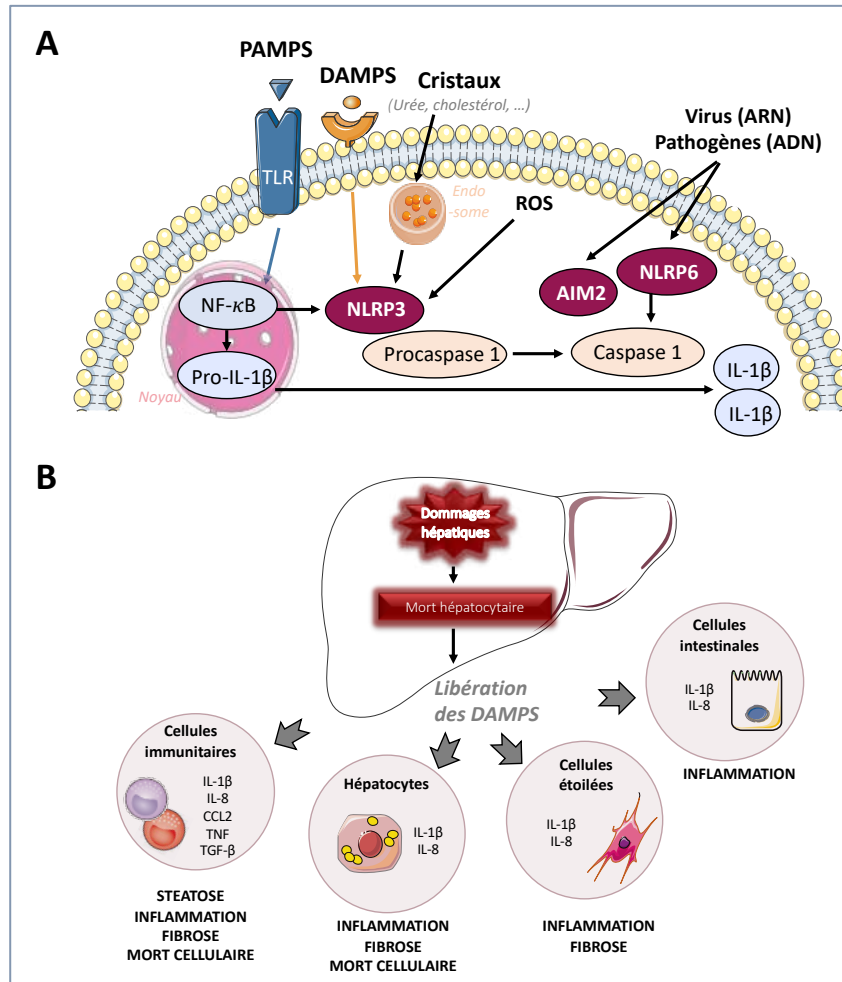


FIGURE 15. ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME DANS LA NAFLD

A. Schématisation des voies de l'inflammasome et des acteurs impliqués dans son activation. Les PAMPs et les DAMPs se fixent à des récepteurs cellulaires en surface ou bien dans la cellule. Les cristaux (urée et cholestérol) externes ou internes, ainsi que les pathogènes activent l'inflammasome, NLRP3 et NLRP6 respectivement. **B.** Les dommages hépatiques induisent la mort hépatocytaire, responsable de la libération de DAMPs dans le milieu extracellulaire, ce qui a pour conséquence d'activer les cellules immunitaires, les hépatocytes environnants ainsi que les cellules étoilées. En retour, ces cellules sécrètent des facteurs stéatogènes, pro-inflammatoires et pro-fibrosants. Il existe également un lien important entre intestins et foie. Du fait de la perméabilité intestinale, le LPS se retrouve dans le sang puis au niveau hépatique et promeut l'inflammation. Adapté d'après (Szabo and Petrasek, 2015).

3.3.6 Recrutement et activation des cellules immunitaires

Le foie est un organe qui possède un système immunitaire particulier et adapté. Il est en contact direct avec les antigènes microbiens et les endotoxines circulantes qui ont pour conséquence l'activation des cellules de l'immunité innée (macrophages, neutrophiles, etc...). En condition d'homéostasie, de nombreux mécanismes assurent l'immunosuppression des réponses immunitaires afin de maintenir une tolérance. Cependant, lors d'agressions, une réponse immunitaire peut rapidement se mettre en place. Les cellules parenchymateuses (hépatocytes et cholangiocytes) mais également les cellules étoilées et les cellules endothéliales sont des senseurs directs d'agressions. Comme nous l'avons vu, les PRR et l'inflammasome en sont les acteurs moléculaires. Les macrophages résidents du foie, les cellules de Kupffer sont les principaux acteurs inflammatoires hépatiques. De plus, les cellules myéloïdes scannent la vascularité hépatique et sont également capables d'infiltrer le foie en cas d'agressions. Les cellules dendritiques activent l'immunité adaptative de par leur capacité de présentation antigénique (Jenne and Kubes, 2013). En condition physiologique, les cellules de Kupffer maintiennent un environnement anti-inflammatoire en sécrétant de l'IL-10 et en exprimant à leur surface des molécules inhibitrices des lymphocytes T (LT) comme PD-L1 (**Programmed cell Death 1 Ligand 1**), même lorsqu'ils sont stimulés avec du LPS. Ces lymphocytes T sont maintenus dans un état de tolérance, mais peuvent être « trappés » via des molécules d'adhésions exprimées par les Kupffer et les cellules étoilées afin de déclencher une réponse immunitaire (Heymann and Tacke, 2016). La majorité des lymphocytes (40%) retrouvés dans le foie sont des cellules **Natural Killer (NK)** qui exercent des fonctions uniquement lorsqu'elles sont activées, notamment par les Kupffer. Les cellules **Natural Killer T (NKT)**, elles, patrouillent l'endothélium hépatique et sont activées par les Kupffer, suite à une interaction cellule-cellule qui conduit au relargage d'IL-4 et d'IFN γ (Jenne and Kubes, 2013).

Lors de la NAFLD, la lipotoxicité hépatique et le stress oxydant conduisent à un processus de nécro-inflammation chronique du tissu suite à la libération de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8, sous le contrôle de la voie NF- κ B. Une réponse inflammatoire se met alors en place afin d'éliminer les cellules mortes, et induit également la régénération du tissu en autorisant la prolifération hépatocytaire. Cette prolifération compensatoire a lieu, à bas bruit, et de façon chronique. Elle permet de maintenir la structure et les fonctions hépatiques (Nakagawa et al., 2014a; Wolf et al., 2014). Cependant,

lorsque l'inflammation ne parvient plus à contrôler les lésions du tissu hépatique, une réponse inflammatoire chronique se met en place, conduisant à des dommages irréversibles du parenchyme hépatique, favorisant l'installation d'une fibrose et/ou d'un **carcinome hépatocellulaire (CHC)** (Luedde and Schwabe, 2011). L'étude princeps du laboratoire de Michaël Karin, a montré que l'inflammation induite lors de la stéatose représente un terrain favorable aux évènements de carcinogenèse. L'administration du carcinogène DEN à des souris sous régime HFD induit un développement beaucoup plus drastique de tumeurs comparativement à des souris sous régime standard (Park et al., 2010a). Les facteurs pro-inflammatoires, IL-6 et TNF, sont deux facteurs importants pour le développement de la maladie et la transition vers le CHC, et sont associés à une augmentation de la quantité de macrophages et de leucocytes. La suppression du gène de l'IL-6 suffit à empêcher l'apparition de cancers hépatiques (Park et al., 2010a). Il a notamment été rapporté que le TNF α et l'IL-6 sont corrélés avec la NAFLD, et plus le stade de la pathologie est sévère, plus les niveaux de ces deux cytokines sont élevés (Crespo et al., 2001; Wieckowska et al., 2008). Le TNF α conduit aussi à l'activation de la voie NF-kB qui va alors activer un ensemble de réponse pro- ou anti-apoptotique au niveau de l'hépatocyte.

Dans la NAFLD, la pléthore de cellules immunitaires et d'actions immunitaires résultantes est donc perturbée. Depuis, de nombreuses études s'intéressent à caractériser les modifications du microenvironnement immunitaire hépatique retrouvées dans la NAFLD. On retrouve une infiltration de **neutrophiles** qui viennent soutenir la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Liang et al., 2014). L'implication des **Kupffer**, des NKT et des lymphocytes a été massivement étudiée. Lors de la NAFLD, l'une des premières étapes histologiques est une infiltration portale de macrophages qui se produit dans la même fenêtre de temps que la stéatose (Gadd et al., 2014). Différentes études ont montré que les cellules de Kupffer se localisent autour des hépatocytes endommagés (Kazankov et al., 2019; Lotowska et al., 2013). Les cellules de Kupffer influencent l'inflammation et l'insulino-résistance (McNelis and Olefsky, 2014), et présentent des marqueurs d'activation chez les patients obèses. Ces marqueurs sont notamment corrélés avec la sévérité de la pathologie (Wan et al., 2014). Les Kupffer présentent en plus un rôle important dans la mise en place de la fibrose en promouvant l'inflammation par le TNF α et le recrutement des leucocytes, dans un modèle murin de NASH (MCD) (Tomita et al., 2006). De façon globale, la suppression des macrophages par l'inhibition du marqueur CD163+, le clodronate ou l'inhibition de la voie CCL2-CCR2 améliore la NASH (Baek et al., 2012;

Reid et al., 2016; Svendsen et al., 2017). Par ailleurs, les cellules **NKT** sont accumulées chez les patients NASH et sont associées à la sévérité de la maladie, notamment au stade de la cirrhose (Syn et al., 2010). L'équipe de Mathias Heikenwälder a montré à l'aide d'une cohorte humaine et d'un modèle murin de NASH (CD-HFD) que les **NKT** peuvent promouvoir la stéatose. La sécrétion de la cytokine LIGHT sur l'hépatocyte favorise la prise en charge des AG. Cela rend permissif le passage de l'état de stéatose au développement d'un CHC via l'activation des voies canoniques et non-canoniques de NF- κ B (Wolf et al., 2014). De plus, les NKT peuvent directement activer les cellules étoilées par les voies de signalisation Hedgehog et ostéopontine, et favorisent ainsi l'installation de la fibrose. La déficience de souris en cellules NKT protège de l'apparition d'une fibrose, dans un modèle murin MCD (Syn et al., 2012). De même, la propagation de la NASH semble être reliée avec la présence des **lymphocytes** TH17, T CD4+ et T CD8+. Une étude a montré que les TH17 présentent un rôle pro-tumorigène dans un système de NASH particulier (surexpression d'un répresseur transcriptionnel – URI). Dans ce modèle, les dommages hépatocytaires induits par la NASH permettent l'activation des TH17 et notamment la sécrétion d'IL17A, qui provoque l'infiltration de neutrophiles dans le tissu adipeux. Cela conduit à une augmentation de la lipolyse et donc la libération d'AG libres dans la circulation, ce qui aggrave la NASH et induit l'émergence de CHC (Gomes et al., 2016). La présence de LT CD8+ cytotoxiques est également un facteur d'aggravation conduisant à la carcinogenèse hépatique (Sutti et al., 2014; Tang et al., 2011; Wolf et al., 2014). Cependant, une étude du groupe de Michael Karin a montré que des plasmocytes exprimant des IgA s'accumulent dans les foies de patients NAFLD et dans des modèles murins de NASH (MUP-uPa + HFD et STAM). Ils exercent une action immunosuppressive sur les LT CD8+ cytotoxiques en exprimant les molécules anti-inflammatoires (PD-L1 et IL-10). Dans ces modèles la délétion du marqueur CD8, entraînant une déplétion de LT CD8+, accélère la tumorigenèse suggérant que les cellules cancéreuses sont éliminées dès leur apparition par les LT CD8+. De façon cohérente, la déplétion des plasmocytes IgA+ réduit la carcinogenèse, puisque les LT CD8+ ne sont plus immunosupprimés (Shalapour et al., 2017). Les LT CD4+, eux, sont diminués. Cela est cohérent avec une étude montrant, dans un modèle de CHC induit sur fond de NASH (expression de c-Myc en régime MCD), que la déplétion de LT CD4+ accélère la croissance tumorale (Ma et al., 2016). Enfin, très récemment, le groupe de M. Heikenwälder montre que le nombre de **plaquettes**, l'activation et l'agrégation de celles-ci sont augmentés dans la NASH, aussi bien chez le patient que dans de nombreux modèles murins (CDHFD, HFHS, High-cholestérol,

Western diets, MCD et URI). L'équipe met en évidence, dans ces modèles, que les plaquettes sont les premiers éléments à infiltrer le foie, après seulement quelques semaines de régime et qu'elles sont capables d'activer les cellules de Kupffer. Finalement, l'utilisation de médicaments antiplaquettaires permet de prévenir la NASH et la survenue de CHC en empêchant l'infiltration des cellules immunitaires dans le foie (Malehmir et al., 2019) (Figure 16).

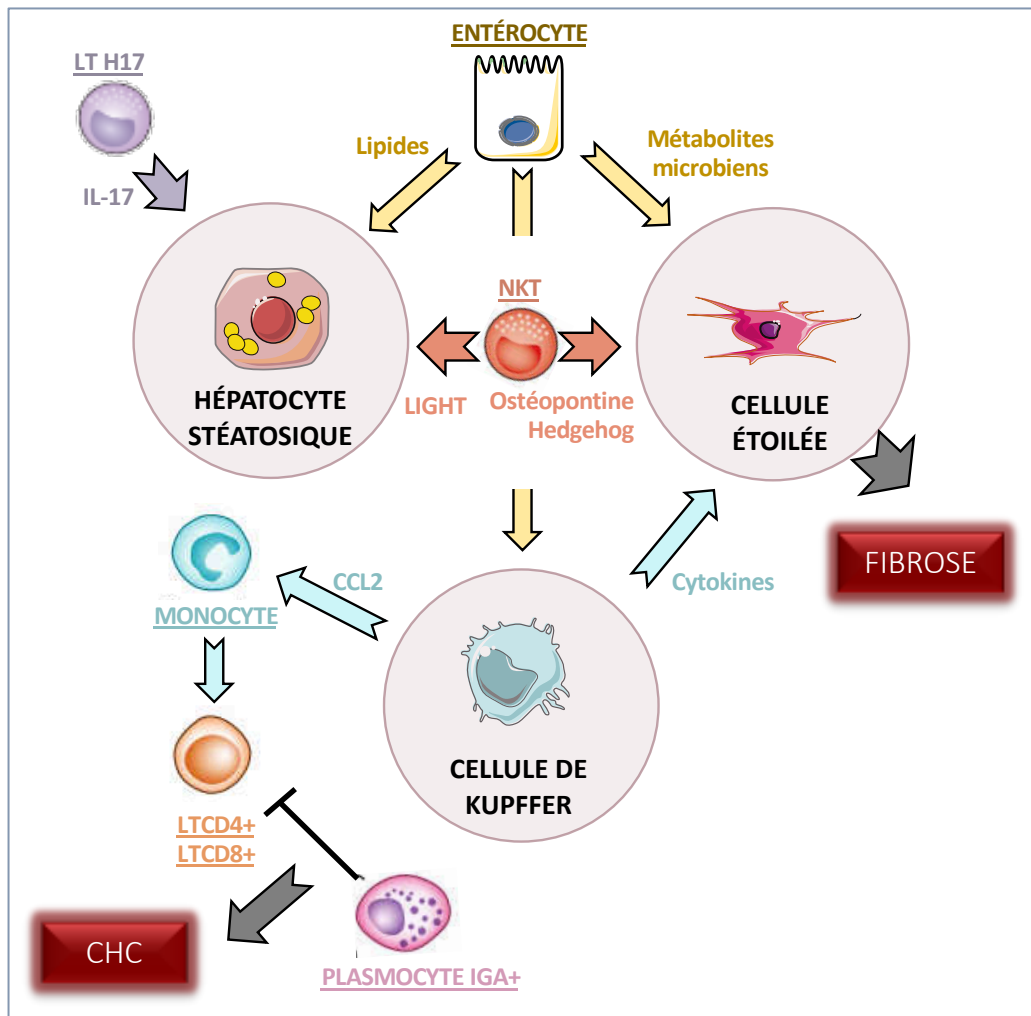


FIGURE 16. RECRUTEMENT ET ACTIVATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE DANS LA NAFLD

Représentation schématique du recrutement des cellules immunitaires au niveau du foie. La libération de métabolites microbiens et PAMPs de l'intestin vers le foie, l'activation des cellules étoilées et de Kupffer par le dérèglement métabolique hépatique contribuent au recrutement et à l'activation des cellules immunitaires. L'inhibition des LT CD8+ par les plasmocytes IgA+ favorise la survenue de CHC. Adapté d'après (Ringelhan et al., 2018).

4 Altération de la capacité proliférative dans la NAFLD

4.1 Altération de la prolifération

Le foie est constamment exposé à des agressions intrinsèques et extrinsèques, provenant notamment du tractus gastro-intestinal. Pour maintenir les fonctions hépatiques, les hépatocytes ont une impressionnante capacité de régénération permettant de palier la mort des hépatocytes et même de régénérer le foie *ad integrum*. Cette régénération hépatique peut avoir lieu de façon aiguë ou chronique et dépend de la nature et du temps de l'agression. La régénération induite de façon aiguë provoque une synchronisation des réponses cellulaires alors qu'un stress chronique forme des cycles de lésions-régénérations similaires à une réponse de cicatrisation (Caldez et al., 2020).

La NAFLD est justement caractérisée par des cycles de lésions-régénération induits suite au processus de nécro-inflammation chronique. Cela conduit à la libération de cytokines pro-inflammatoires permettant une prolifération compensatoire des hépatocytes (Park et al., 2010a; Wolf et al., 2014). Cependant, il est communément admis que la stéatose hépatique est associée à des échecs de procédures chirurgicales et à un risque de mortalité accrue en post-opératoire notamment après transplantation ou résection hépatique (McCormack et al., 2007). En conséquence, malgré le manque d'organes disponibles, les foies présentant plus de 30% de stéatose ne sont pas utilisés pour les transplantations hépatiques en raison du trop grand risque qu'ils représentent (Dutkowski et al., 2015). Bien que personne n'ait pu étudier précisément les mécanismes aboutissant à ces complications en cas de stéatose, des études montrent que les hépatocytes stéatosiques présentent une diminution de leurs capacités régénératives. L'une des études princeps a montré chez le rat Zucker, que les animaux obèses soumis à une hépatectomie partielle présentent des capacités régénératives diminuées, avec notamment un retard d'entrée dans le cycle cellulaire suite à un blocage en phase G1. De plus, 30% de ces animaux ne survivent pas (Selzner and Clavien, 2000). Ces résultats initiaux mettaient donc en lumière l'hypothèse que l'accumulation lipidique régulait négativement la division cellulaire. Une dizaine d'année plus tard, il a été démontré l'existence d'une corrélation inverse entre le niveau de stéatose hépatique et l'expression du récepteur à l'EGF (EGFR) hépatique chez le patient obèse (Collin de l'Hortet et al., 2014). Cette même étude décrit, à partir de modèles murins (ob/ob et MCD), que la régénération hépatique n'est pas induite suite à une déficience dans la signalisation de l'hormone de croissance. L'apport de cette dernière

aux souris permet de soutenir partiellement la régénération après hépatectomie partielle. Par ailleurs, une autre étude montre que la réplication est également ralentie mais est aussi associée à un stress du réticulum endoplasmique dépendant de XBP1. L'apport d'un médicament empêchant la mise en place du stress du RE (l'acide tauroursodeoxycholique) permet de restaurer la durée physiologique de régénération chez les animaux (Hamano et al., 2014).

Au cours de ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées à caractériser la présence de marqueurs sénescents dans la stéatose, et à savoir si certaines populations sénescents pouvaient participer à l'évolution de la pathologie (Papatheodoridi et al., 2020). Le développement de la NAFLD est associé, comme il a été décrit, à de nombreuses défaillances moléculaires et cellulaires, incluant une dérégulation métabolique, une lipotoxicité et une réponse pro-inflammatoire. L'ensemble de ces événements concourt à l'installation d'une sénescence cellulaire. La sénescence est définie comme une incapacité cellulaire à proliférer, et peut être déclenchée par une pléthore d'évènements : la présence de dommages de l'ADN au niveau chromosomique ou télomérique, l'accumulation de ROS, l'expression d'oncogènes ou encore les thérapies anticancéreuses (radiations et chimiothérapies). La sénescence se subdivise en deux groupes : La sénescence répllicative induite par l'érosion ou le raccourcissement des télomères, et la sénescence induite par un stress. Cependant, les deux groupes activent la même cascade de signalisation, via l'activation du point de contrôle des dommages de l'ADN (« DNA Damage Response - DDR ») initiant l'activation de mécanismes de réparation de l'ADN et/ou l'inhibition du cycle cellulaire. La mise en place du DDR sera développée dans le prochain chapitre. Il est important de noter que l'activation du DDR conduit à l'activation de p53, p21 et p16, trois acteurs importants dans l'arrêt du cycle cellulaire. Les deux derniers inhibent notamment la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb), ne permettant pas l'activation des facteurs de transcription E2F, et bloquant de ce fait la progression dans le cycle cellulaire (Aravinthan, 2015). La cellule sénescence possède des caractéristiques bien particulières. En effet, au microscope, elle apparaît élargie et aplatie avec un noyau gonflé et présente des foci d'hétérochromatines (Senescence-Associated Heterochromatin Foci - SAHF). La cellule sénescence n'est pas métaboliquement inactive et possède un marqueur enzymatique bien caractéristique : une activité β -galactosidase. Elle possède également un sécrétome très particulier appelé SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) incluant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et IL-

8), de chimiokines (**Monocyte Chemoattractant Protein 1 - MCP-1**) et des facteurs de croissance. Ces facteurs ont pour conséquence de participer à l'inflammation du tissu en attirant des cellules immunitaires qui éliminent ces cellules sénescentes. Également, par action paracrine, ces SASP favorisent la mise en place d'un programme de sénescence sur les cellules environnantes ([Papatheodoridi et al., 2020](#); [Tchkonia et al., 2013](#)).

La sénescence hépatocytaire a été démontrée à partir de biopsies de patients NAFLD. L'étude d'Aravinthan et al. montre que la taille des télomères est diminuée et est associée à un arrêt de prolifération des hépatocytes de façon p21-dépendant. De manière intéressante, le marqueur de dommage de l'ADN – γ H2AX – est positivement corrélé avec le score de stéatose, indiquant une association entre activation du DDR et sénescence ([Aravinthan et al., 2013](#)). Cette étude met en lumière que la sénescence hépatocytaire pourrait être induite de façon télomère-dépendante et stress-dépendante. L'expression des messagers p21 et p16 a été confirmée dans un modèle de rats soumis à un régime HFD ([Zhang et al., 2012](#)). De façon intéressante, les rats développant une stéatose plus sévère montrent des niveaux d'expression de p16 et p21 plus élevés que les rats ayant une stéatose modérée, qui est associée à une diminution de la phosphorylation de la protéine Rb. Il s'agit en fait d'une régulation épigénétique autorisant l'expression des gènes p16 et p21 suite à une acétylation et déméthylation de leurs promoteurs et de leurs régions codantes ([Zhang et al., 2012](#)).

Par la suite, l'étude d'Ogrodnik et al, montre dans un modèle murin de stéatose, que les foies présentent des hépatocytes sénescents ayant en outre des dommages télomériques et des SAHF. Par l'utilisation de modèles expérimentaux innovants, les auteurs sont capables de supprimer les hépatocytes sénescents dès leur formation, suite à l'expression du marqueur p16. Ainsi, il prouve que la suppression de ces cellules améliore la stéatose aussi bien dans des modèles d'obésité, de diabète et de vieillissement. A l'inverse lorsque la sénescence est induite par une dysfonction d'un système de réparation de l'ADN, la stéatose est augmentée dans ces différents modèles. De façon intéressante, des hépatocytes en culture rendus sénescents exhibent une diminution de la capacité mitochondriale à oxyder les acides gras et donc à les métaboliser. Enfin, en analysant des biopsies humaines de patients NAFLD, les auteurs confirment que les dommages télomériques et l'expression de p21 sont associés à la sévérité de la maladie ([Ogrodnik et al., 2017](#)).

4.2 Polyploïdisation pathologique dans la NAFLD

Pour rappel, le foie des mammifères est principalement composé de cellules diploïdes et tétraploïdes binucléés (2x2n). Il existe des différences dans la distribution de ces contingents cellulaires au sein des espèces. Le foie d'un jeune rongeur (4 semaines de vie) peut être constitué jusqu'à 40% de cellules binucléées alors que seulement 15% de ces cellules sont présentes dans le foie humain adulte (Bou-Nader et al., 2019; Pandit et al., 2012). Lors du développement post-natal, un programme contrôlé de cytotdiérèse incomplète se met en place, amenant à la genèse de ces cellules binucléées. Ce processus est sous contrôle de la voie de l'insuline (Celton-Morizur et al., 2009). La NAFLD se caractérise notamment par des phénomènes d'insulino-résistance, et par conséquent des pertes de sensibilité de cette voie. Ainsi, le laboratoire s'est intéressé à comprendre si la dérégulation de la voie de l'insuline pouvait entraîner des dérégulations de la polyploïdie physiologique hépatocytaire.

L'équipe montre dans un premier temps, à l'aide d'analyses *in situ*, sur des modèles murins de NAFLD (*ob/ob*, PTEN^{ko}, MCD et HFD) que les contingents diploïdes et binucléés se retrouvent diminués, comparativement à des souris contrôles (Gentric et al., 2015b). Dans l'étude, les foies des souris contrôles de huit semaines sont constituées à 30% et 43% d'hépatocytes diploïdes et binucléés respectivement, alors que les souris *ob/ob* n'en contiennent que 10% et 17%. Cependant, de façon très intéressante, le profil d'hépatocytes mononucléés 4n et $\geq 8n$ est fortement augmenté passant de 22% à 34% et de 5% à 40% respectivement. A l'instar des souris NAFLD, les patients NASH présentent une augmentation de cette polyploïdie hépatocytaire nucléaire principalement $\geq 8n$. Afin d'analyser le type d'altérations moléculaires générant cette modification de ploïdie, l'équipe a utilisé des cultures primaires d'hépatocytes murins synchronisés dans le cycle cellulaire. Malgré l'accumulation de la cycline B au cours de la phase G2, la M-CDK (CDK1) reste phosphorylée sur la tyrosine 15, ce qui empêche le complexe de s'activer, et donc d'initier la transition G2/M. C'est en fait l'activation de la signalisation du DNA Damage Response (ATR/p53/p21) qui bloque le cycle cellulaire. Les hépatocytes stéatosiques se divisent donc par endoréplication.

Le lipotoxicité et l'accumulation consécutive des ROS étant l'une des caractéristiques majeures se produisant dans l'hépatocyte stéatosique, l'équipe a cherché à comprendre si ces éléments pouvaient être une cause de l'endoréplication et de l'activation du DDR. Ainsi les souris NAFLD (*ob/ob*) et les cultures primaires ont été traitées avec un antioxydant (**N-Acétyl-**

Cystéine - NAC), de façon à contrebalancer l'accumulation des ROS. Le NAC est suffisant pour (1) diminuer l'activation du DDR *in vitro* et rétablir une cinétique de division correcte et, (2) restaurer le cycle de division normal *in vivo*. Ces résultats suggèrent que l'endommagement de l'ADN induit par le stress oxydant, bloque la division des hépatocytes suite à l'activation du DDR. Les hépatocytes sortent donc du cycle cellulaire en omettant la mitose et deviennent polyploïdes (Figure 17) (Gentric et al., 2015b).

Il est important de noter qu'une étude plus récente menée chez quelques patients stéatosiques ne montre pas d'altérations de ploïdie (Segovia-Miranda et al., 2019). Il semblerait donc que chez le patient, la modification du profil de ploïdie soit observée qu'à partir du stade NASH ; période pendant laquelle l'accumulation de dommages de l'ADN s'accroît et provoque une instabilité génomique (Nakagawa et al., 2014b).

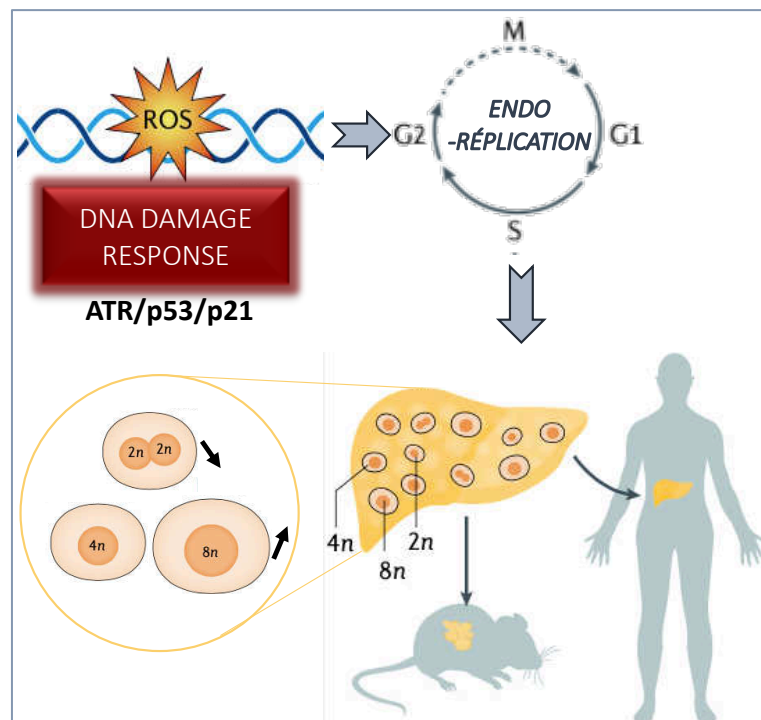


FIGURE 17. INSTALLATION D'UNE PLOÏDIE PATHOLOGIQUE DANS LA NAFLD

Représentation schématique du phénomène de polyploïdisation pathologique lors de la NAFLD. L'accumulation des ROS endommage l'ADN ce qui conduit à l'activation du DDR bloquant l'entrée en mitose des hépatocytes. L'hépatocyte se divise donc par endoreduplication, ce qui génère des hépatocytes polyploïdes mononucléés. Une diminution du contingent binucléé tétraploïde ($2 \times 2n$) et une augmentation des contingents mononucléés tétraploïdes ($4n$) et octoploïdes ($8n$) sont observées. Adapté de (Donne et al., 2020).

Dans cette deuxième partie, il apparaît que la NAFLD est un véritable fléau mondial dont la prévalence ne cesse d'augmenter. La stéatose hépatique peut notamment évoluer vers une forme inflammatoire sévère (la NASH), qui peut elle-même aboutir à l'installation d'une cirrhose et/ou d'un carcinome hépatocellulaire. Aujourd'hui, il n'existe malheureusement pas de traitements médicamenteux pour cette pathologie. Heureusement, depuis ces dix dernières années, un nombre croissant de modèles, principalement murins, permet de mieux caractériser la maladie et d'appréhender des mécanismes cellulaires et moléculaires afin d'être potentiellement ciblés par des outils thérapeutiques.

L'installation de la stéatose entraîne de nombreuses dérégulations métaboliques conduisant à un phénomène de lipotoxicité qui promeut alors la dérégulation des organelles. Le stress oxydant, le stress du réticulum endoplasmique ainsi que l'inflammasome conduisent à une dysfonction du tissu adipeux, du tissu hépatique et de la barrière intestinale. L'inflammation joue également un grand rôle dans le renforcement de ces dérégulations et l'aggravation de la maladie.

Au niveau de l'hépatocyte, ces acteurs conduisent à la mort cellulaire et à une prolifération compensatoire des autres hépatocytes. Cependant, il est communément admis que la stéatose hépatique est associée à des échecs de procédures chirurgicales et à un risque de mortalité accrue en post-opératoire notamment après transplantation ou résection hépatique. Les hépatocytes stéatosiques apparaissent engagés dans une voie de sénescence associée à un raccourcissement des télomères, la présence de SAHF et l'activation des protéines p21, p16 et p53. De manière intéressante, le marqueur de dommage de l'ADN – γ H2AX – est positivement corrélé avec le score de stéatose, indiquant une association entre dommages de l'ADN, activation du DDR et sénescence. De plus, le laboratoire a mis en évidence la genèse d'une polyploïdie pathologique, formée de contingents mononucléés polyploïdes. Ces cellules apparaissent à la suite de cycles d'endoréplication, induits par l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR). Ainsi, l'activation du DDR dans la NAFLD semble être un événement majeur permettant la progression de la maladie.

III. La réponse aux dommages de l'ADN (DDR)

La réponse aux dommages de l'ADN fait intervenir un grand nombre d'acteurs dont trois principaux (ATM, ATR et DNA-PK) qui permettent la réparation de ces lésions mais qui promeuvent également une réponse cellulaire dépendant d'une balance Survie/Mort.

1 La voie du « DNA Damage Response »

1.1 Structure protéique des acteurs de la voie

D'un point de vu protéique, les trois kinases ATM, ATR et DNA-PK, présentent de très fortes homologies de séquences. Ce sont d'importants polypeptides (entre 300 et 470 kDa) qui contiennent trois grands domaines structuraux : (1) Les répétitions HEAT qui permettent les interactions protéines-protéines ; (2) Les domaines FAT et (3) kinases qui peuvent être phosphorylés (**Figure 18**). Ces kinases phosphorylent préférentiellement des résidus sérine/thréonine suivis d'une glutamine (S/T-Q). Elles sont également capables de s'autophosphoryler malgré des implications toujours très discutées aujourd'hui ([Blackford and Jackson, 2017](#)). L'autophosphorylation d'ATM permettrait notamment la transition d'une forme inactive dimérique en forme active monomérique. Enfin, leur stabilisation dépend de cofacteurs protéiques : NBS1 pour ATM ; ATRIP pour ATR et Ku80 pour DNA-PK ; ce qui permet de déclencher la réparation des dommages et l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN (DNA Damage Response – DDR) ([Blackford and Jackson, 2017](#)).

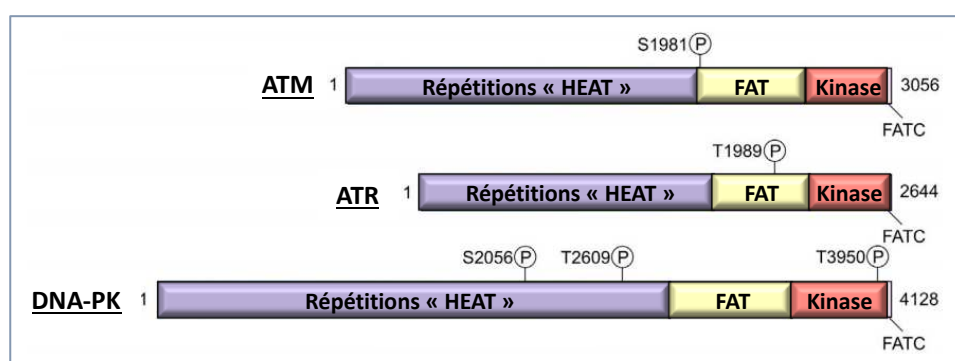


FIGURE 18. DOMAINES STRUCTURAUX DES PROTEINES ATM, ATR ET DNA-PK

Représentation des domaines structuraux protéiques sous forme de boîtes colorées des trois protéines. Le nom « HEAT » provient de quatre protéines possédant ce type motif : l'huntingtine (H), le facteur d'élongation eucaryotique 2 (E), la protéine phosphatase 2A (A) et la kinase Tor1 (T)3. Les sites de phosphorylations principales sont marqués d'un « P » entouré ([Blackford and Jackson, 2017](#)).

1.2 Les acteurs de la voie

L'ADN nucléaire est le siège de nombreuses attaques et modifications qui se répartissent différemment le long du cycle cellulaire. On distingue ainsi les lésions se produisant en G0/G1 de celles induites en réplication (phase S). De nombreuses molécules peuvent endommager l'ADN comme les ultraviolets, les radiations ionisantes, les inhibiteurs de topoisomérases, les ROS et générer ainsi des décalages de séquences (« mismatch »), des adduits de l'ADN (fixation d'une molécule), des réticulations (« cross-links ») ou alors des cassures simple- ou double-brin de l'ADN. Cependant, afin de répondre à ces attaques, les cellules disposent de moyens de protections efficaces permettant **(1)** de reconnaître le type de lésion, **(2)** d'initier la cascade de réparation associée, et **(3)** d'activer un point de contrôle (« checkpoint ») permettant de ralentir ou de retarder le cycle cellulaire. Afin d'éviter la propagation de cellules mutées, les organismes multicellulaires ont développé des réponses adaptées permettant la sortie du cycle, conduisant à un mécanisme de sénescence, de polyploïdisation ou de mort cellulaire (Blackford and Jackson, 2017).

La réponse aux dommages de l'ADN (DDR), prend racine au niveau de trois kinases senseurs de dommages : **ATM** (Ataxia Telangiectasia Mutated), **ATR** (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related) et **DNA-PK** (DNA-dependent protein kinase). Ce sont en réalité des phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-related kinases (PIKKs) induisant une cascade de signalisation par phosphorylations protéiques.

DNA-PK: Découverte en 1985 de façon non-volontaire en ajoutant de l'ADN double-brin à des extraits cellulaires, la DNA-PK est essentielle pour la réparation des cassures double-brin de l'ADN par le non-homologous end joining (NHEJ) (Walker et al., 1985). Son activation requière la présence des deux sous-unités de la protéine Ku (Ku70 et Ku80) (Gottlieb and Jackson, 1993).

ATM : L'ataxie télangiectasie, aussi nommée syndrome de Louis-Bar, est une maladie rare héritée de façon autosomique récessive, qui se caractérise par une dilatation des vaisseaux sanguins (télangiectasie) et un déclin progressif neurologique provoquant un manque de coordination des mouvements volontaires (ataxie). Ces patients présentent aussi une immunodéficiences et une prédisposition aux cancers, notamment lymphoïdes. Ils sont également très radiosensibles au niveau chromosomique suggérant un manque de réparation de l'ADN endommagé (Taylor et al., 2015). Au niveau cellulaire, les leucocytes de patients ne présentent pas d'induction des points de contrôle du cycle cellulaire lorsque la cellule est

irradiée, notamment par un manque d'activation de p53 (Taylor et al., 1975). La déficience de la protéine ATM fût identifiée en 1995 chez les patients atteints de ce syndrome (Savitsky et al., 1995).

ATR : Le rôle de la protéine ATR fût découvert chez la levure en 1994, suite à une analyse à large échelle protéique permettant d'identifier des protéines impliquées dans la mise en place des points de contrôle lors des phases S et G2 (Weinert et al., 1994). Ainsi, les protéines MEC1 et RAD3 furent découvertes. Les mutants étant sensibles aux UV, à l'irradiation et à l'hydroxyurée (inhibiteur de la réplication). C'est en 1996, que l'homologue de la protéine RAD3 est découvert chez l'Homme, et est nommée ATR (Bentley et al., 1996). La mutation du gène *ATR* est responsable du syndrome de Seckel induisant des problèmes développementaux avec notamment un nanisme microcéphalique (O'Driscoll et al., 2003).

1.3 Les différentes voies de réparation de l'ADN

Il existe différentes voies de réparation de l'ADN qui couvrent l'ensemble des altérations de l'ADN (endommagement des bases et cassures double-brin). La réparation des bases ou des nucléotides par excision (RBE/RNE – BER/NER pour *Base or Nucleotide Excision Repair*) et la réparation des décalages (*MisMatches Repair* - MMR) reconnaissent différentes altérations des bases et nucléotides alors que le NHEJ et la recombinaison homologue permettent la résolution des cassures double-brin de l'ADN à des temps différents du cycle cellulaire. Il est important de noter que le BER, le NER et le MMR ne provoquent pas l'activation des PIKKs (ATM, ATR et DNA-PK) et n'engendrent donc pas la réponse du DDR.

1.3.1 BER, NER et MMR

La réparation des bases ou des nucléotides par excision (BER/NER) permet l'enlèvement direct de la base ou du nucléotide endommagé (base alkylée, base oxydée, hélice mal-configurée, etc ...) (Figure 19). Le BER est initié par une ADN glycosylase (ex : alkyladenine-DNA glycosylase – AAG) qui excise la base endommagée. Cela génère un site abasique qui est incisé par une endonucléase (apurinic-apyrimidinic endonuclease - APE) afin de supprimer le groupement 3'OH du côté 5' et de laisser apparent le groupement 5'-deoxyribose phosphate (5'-dRP). La polymérase ADN β (Pol β) ajoute la base correspondante. Enfin, la ligase ADN consolide l'ADN en effectuant la liaison de l'extrémité 3'OH libre (Fu et al., 2012).

Le **NER** consiste à enlever une plus grande partie de l'ADN endommagé par les mêmes actions que le BER mais avec des protéines différentes. Un site abasique de 27 à 29 nucléotides est ainsi généré par une combinaison des protéines *Xeroderma Pigmentosum* (XP) XPA, XPC, XPE, XPG, ERCC1, etc... Les polymérase Pol δ ou ϵ ajoutent les nucléotides correspondants et la ligase effectuent les liaisons (Fu et al., 2012).

La réparation des décalages de l'ADN (**MMR**) induits par des bases alkylées (ex : O⁶meG:T) est initiée par les hétérodimères MUTS α et MUTL α qui diffusent le long de l'ADN afin de supprimer l'un des deux brins d'ADN pris en charge par l'exonucléase 1 (EXO1). Celui-ci est réparé par Pol δ , Pol ϵ et une ligase (Fu et al., 2012).

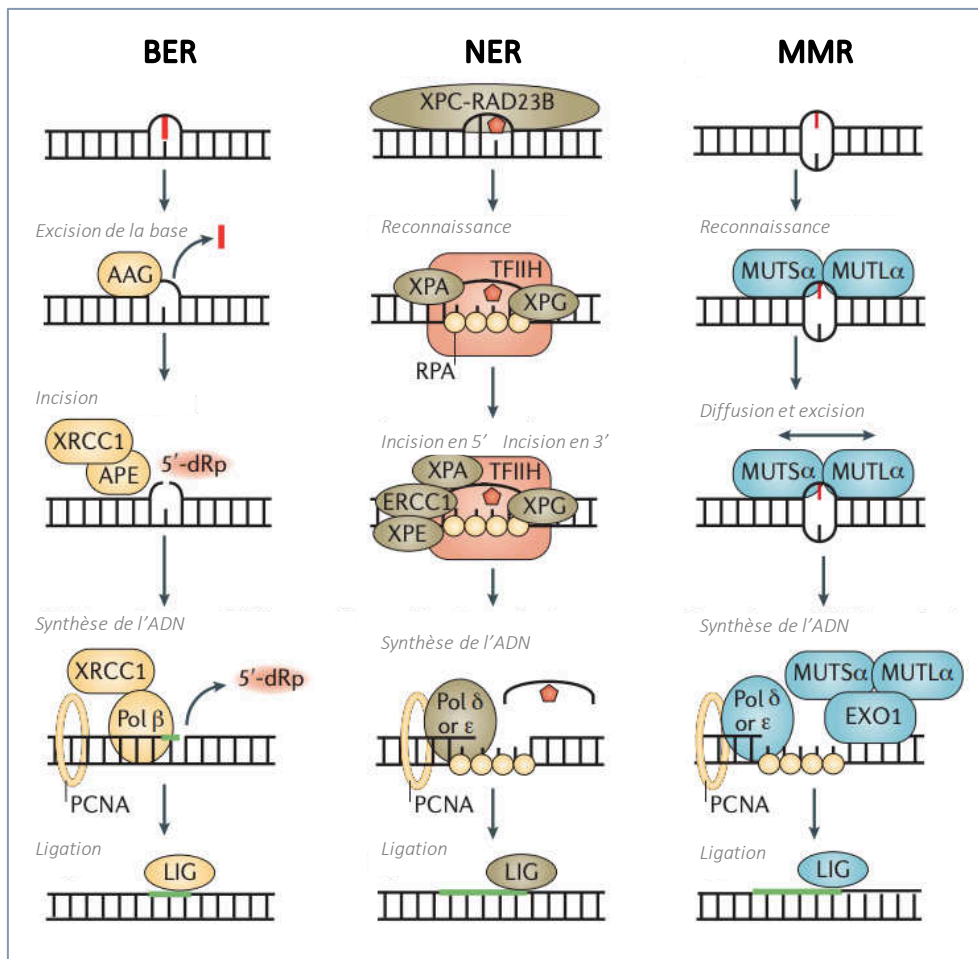


FIGURE 19. REPARATION DE L'ADN PAR BER, NER ET MMR

Représentation schématisée et simplifiée des différentes voies de réparation de l'ADN ne faisant pas intervenir des cassures de l'ADN. Adaptée de (Fu et al., 2012).

1.3.2 Réparation par Non-Homologous End-Joining (NHEJ)

Dans les cellules de mammifères il existe deux processus de NHEJ : le NHEJ classique (cNHEJ) découvert en premier et l'alternatif end-joining (aEJ). Ces deux processus permettent la liaison des deux extrémités d'ADN, antérieurement cassées. Le NHEJ alternatif, moins connu, permet la liaison des extrémités de façon plus rapide et plus efficace. Le cNHEJ, lui, est initié par la fixation des protéines Ku70-Ku80 au niveau des deux extrémités, ce qui conduit au recrutement des autres protéines essentielles du NHEJ dont la DNA-PK, la DNA ligase IV (LIG4) et les protéines de structures (« scaffold ») : XRCC4, XRCC4-like factor (XLF) et les paralogues. Ces protéines se regroupent pour former une synapse temporelle et structurelle permettant l'alignement des deux brins et leur liaison (**Figure 20**) (Scully et al., 2019). Ce sont les deux protéines, DNA-PK et 53BP1 (p53-binding protein 1), véritables senseurs de cassures double-brin (**Double Strand DNA breaks – DSB**), qui promeuvent et contrôlent la réparation par NHEJ (Blackford and Jackson, 2017). Ce phénomène est notamment utilisé de façon physiologique lors du développement des lymphocytes afin de permettre l'expression des TCR (T Cell Receptor) différents, basée sur la recombinaison V(D)J (Arya and Bassing, 2017).

1.3.3 Réparation par Recombinaison Homologue (RH)

Contrairement au NHEJ, la recombinaison homologue (RH) n'opère que lors des phases S et G2 du cycle cellulaire puisque la matrice permettant la réparation de la cassure n'est autre que la chromatide sœur répliquée lors de la phase S. L'ADN comportant la cassure double-brin est pris en charge par le complexe MRN (constitué des protéines MRE11, RAD51 et NSB1), qui permet l'initiation de la RH et sert de complexe d'activation de la protéine ATM. Initialement, le complexe se place en 5' de la cassure, et ce, jusqu'à 300 nucléotides en amont de la lésion. L'activité endonucléase de MRE11 coupe l'ADN et son activité exonucléase 3'-5' étend la coupure. L'activité de MRE11 dépend de l'interaction avec la protéine CtIP (**CtBP-Interacting Protein**). Cette première étape permet d'éloigner les protéines Ku et donc d'inhiber le NHEJ. Ensuite, l'exonucléase 1, l'endonucléase DNA2 et l'hélicase Bloom (BLM) ouvrent l'ADN en 5' et digère le brin 5' afin de former une longue queue d'ADN 3'. Celle-ci est immédiatement fixée par le complexe de la protéine de réplication A (**Replication Protein A - RPA**) (RPA1, 2(=32) et 3) permettant de protéger cet ADN simple-brin. La protéine BRCA2 (**Breast Cancer 2**) permet de remplacer les protéines RPA par des protéines RAD51 ce qui contribue à la formation d'un filament nucléoprotéique capable d'envahir le brin d'ADN de la chromatide sœur, en formant

une D-loop (displacement loop). L'ADN polymérase δ (Pol δ) mais également les polymérases translésionnelles étendent le brin en ayant comme matrice le brin d'ADN de la chromatide sœur. Plusieurs structures d'ADN complexes peuvent ainsi être formées (Figure 20) (Scully et al., 2019).

Le recrutement initial du complexe MRN sert de plateforme pour l'activation de la protéine ATM, notamment suite à sa fixation à NBS1. Cela conduirait notamment à son autophosphorylation et son activation, mais ce mécanisme reste encore discuté. Cependant, une fois activée, la protéine ATM promeut d'une part la recombinaison homologue, et d'autre part l'activation du DDR en phosphorylant le variant X de l'histone H2A sur la sérine 139 (H2AX – γ H2AX). γ H2AX sert ainsi de plateforme pour le recrutement d'acteurs protéiques conduisant à une cascade de phosphorylations, ubiquitylations et modifications post-transcriptionnelles comme p53 (Figure 22). Le suppresseur de tumeur p53 subit ainsi une régulation post-traductionnelle très particulière. En effet, dans un état physiologique, p53 est lié à la protéine MDM2 (*Murine Double Minute 2*) qui empêche son activation, en l'ubiquitylant et l'adressant au protéasome pour dégradation. Cette régulation post-traductionnelle par MDM2 permet de répondre très rapidement à des événements pro-carcinogènes comme la présence de dommages de l'ADN. La signalisation ATM, en phosphorylant p53, déstabilise le complexe MDM2/p53 ce qui conduit à la libération et l'activation de p53 (Blackford and Jackson, 2017).

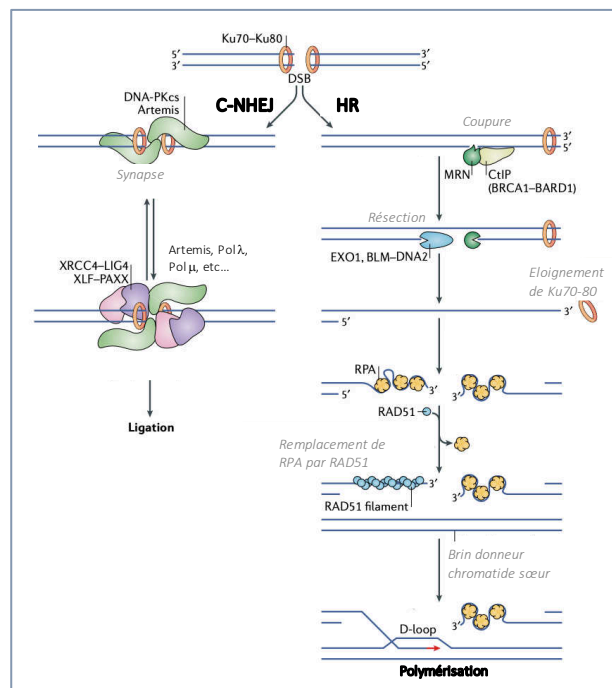


FIGURE 20. REPARATION DE L'ADN PAR C-NHEJ ET HR

Représentation schématique de la réparation par NHEJ et HR. Adapté de (Scully et al., 2019).

1.4 Le stress de réplication

1.4.1 La réplication

Lorsqu'une cellule de mammifère se divise, elle doit intégrer des milliards de nucléotides très rapidement afin de former une copie « parfaite » de chaque chromatide. La réplication est un phénomène faisant intervenir de très nombreux acteurs protéiques dans un cadre spatio-temporel bien déterminé. La **Figure 21** permet de visualiser et d'appréhender cette dynamique.

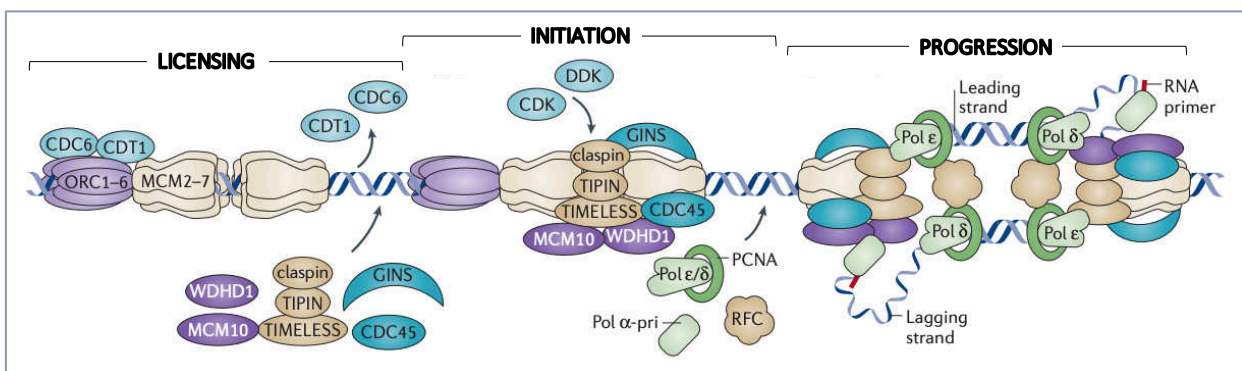


FIGURE 21. LA RÉPLICATION

Représentation schématique des trois « phases » de la réplication. Le « licensing » commence dès la fixation des protéines hélicases MCM au niveau de l'origine de réplication, lors de la phase G1. L'initiation (ou firing en anglais) débute de façon CDK-dépendante lors de la phase S. Il est important de noter que de nombreux complexes MCM sont fixés sur l'ADN mais toutes les origines ne seront pas initiées et resteront sous une forme dormante, et pourront être initiées lors de problèmes réplcatifs. Les polymérases α , ϵ et δ forment la copie de l'ADN grâce au replisome qui permet leur coordination. Adapté de (Gaillard et al., 2015).

1.4.2 Le stress de réplication

De nombreux phénomènes peuvent interférer avec la réplication, et générer un stress que l'on appelle « stress de réplication ». Il se caractérise par une diminution de la vitesse de synthèse d'ADN pouvant aller jusqu'à une pause répliative conduisant à une instabilité génomique si l'arrêt n'est pas rapidement maîtrisé (mutations, réarrangements chromosomiques, etc...). La protéine ATR est la pièce maîtresse contrôlant l'aspect temporel de la réplication. Elle permet notamment de coordonner la mise en place du DDR et de promouvoir la fin de la réplication lors de problèmes. L'activation du DDR par ATR provoque pratiquement la même cascade de phosphorylations qu'ATM, conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 22).

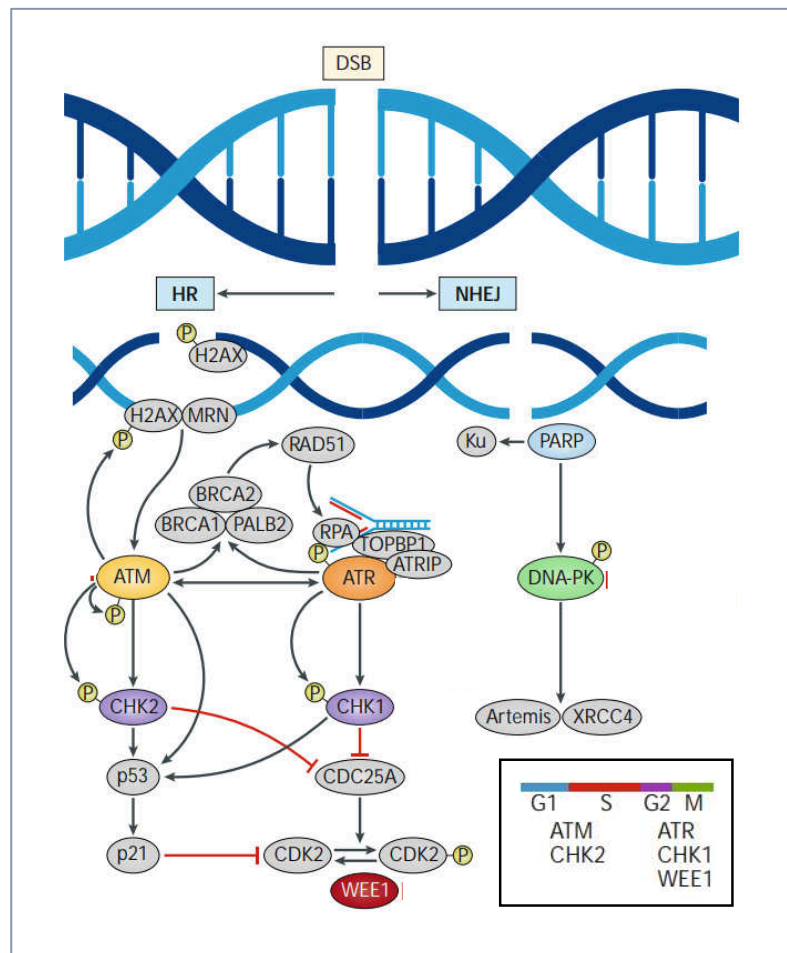


FIGURE 22. SIGNALISATION COMMUNE ATM ET ATR

Représentation schématique de la voie de signalisation activée en réponse à l'activation de la protéine ATM lors de cassures double-brin, et de la protéine ATR lors d'un stress de réplication. Adapté de (Pilié et al., 2019).

1.4.3 Le peignage moléculaire

Il existe actuellement une seule technique permettant de montrer la présence d'un stress de réplication : il s'agit du peignage moléculaire ou « DNA combing/fiber ». Elle permet, en réalité, de mesurer la vitesse de progression des fourches de réplication et de visualiser ainsi les éventuels ralentissement et pauses réplcatifs. Dans un premier temps, des analogues de la thymidine (Iododeoxyuridine (IdU) puis chlorodeoxyuridine (CldU)) sont ajoutés successivement aux cellules afin d'être incorporés dans l'ADN néorépliqué. Ces pulses sont de même durée mais celle-ci peut varier en fonction de la capacité réplcative du type cellulaire. Les cellules sont ensuite récupérées, lysées et l'ADN est inclus dans de l'agarose avant d'être étiré puis « peint ». Un immunomarquage anti-IdU et anti-CldU est réalisé puis visualisé. Ainsi la longueur des fourches néorépliquées est analysée puis rapportée à une échelle de temps (Figure 23). Des analyses de peignage moléculaire ont montré, de façon globale, que les cellules de vertébrés non challengées *in vitro* réplquent à une vitesse de 1 à 2 kb par minute et montrent une asymétrie des fourches d'environ 10-20% témoignant de pauses réplcatives dites physiologiques (Técher et al., 2013).

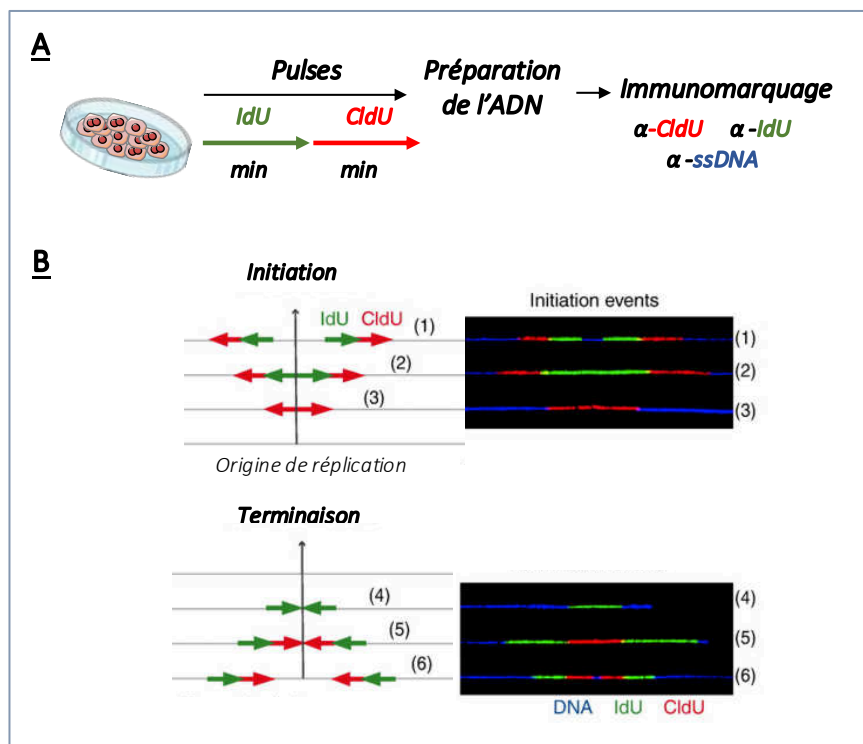


FIGURE 23. LE PEIGNAGE MOLECULAIRE

A. Représentation schématique de la technique. Le temps de chaque pulse (« min ») est déterminé en fonction du type cellulaire et de l'expérience. B. Représentation des types de marquages possibles lors de l'initiation ou de la terminaison des fourches de réplication.

1.4.4 Causes d'un stress de réplication

Il existe de nombreuses causes susceptibles d'induire un stress de réplication. Elles peuvent être d'origines **physiologiques**, **oncogéniques** ou encore **médicamenteuses**.

Séquences à risque. Il existe deux classes de séquences à risque. **(1)** Les séquences présentant des motifs répétés (micro/mini-satellites, homopolymères, éléments transposables, etc...) aussi connues sous le nom de sites fragiles. **(2)** Les séquences capables de former des structures de l'ADN non conventionnelles (Conformations non canoniques l'ADN-B : Triplex d'ADN, tige-boucles, cruciformes, Quadruplexe-G, etc...) qui sont des barrières structurales aux hélicases et polymérase. Les télomères également, de par leurs motif répété, en font une région particulièrement difficile à répliquer (**Figure 24**) (Técher et al., 2017).

Interférences avec la machinerie de transcription. Afin de maintenir et de faire progresser la phase S, un grand nombre de gènes est constamment transcrit. Le partage physique de ces portions d'ADN en cours de réplication (machineries présentes en même temps sur le même fragment), présente plusieurs risques. **(1)** Un risque de collisions susceptibles de générer des cassures de l'ADN. **(2)** Un stress topologique issu de la rencontre des hélicases des deux machineries. **(3)** Un stress mécanique issu des structures hybrides ADN-ARN (R-loop) formées de façon transitoire. Elles sont résolues par un mécanisme très similaire du NER (**Figure 24**) (Técher et al., 2017).

Déplétion des dNTPs. Il a été estimé que le pool de **déoxyribonucléotides triphosphate** (dNTPs), lors de la phase S, s'épuise en quelques minutes s'il n'est pas renouvelé (Murthy and Reddy, 2006). Il est important de maintenir une balance positive de production de l'ensemble des dNTPs et de façon équitablement répartie entre les quatre dNTPs pour que la réplication s'effectue correctement (Poli et al., 2012). L'étape limitante dans la production des dNTPs se fait au niveau de l'enzyme RNR (**RiboNucleotide Réductase**) qui convertit les ribonucléotides **diphosphate** (NDPs) en **déoxyribonucléotides diphosphate** (dNDPs). Il s'agit d'un complexe protéique contenant deux copies de la sous-unité catalytique R1 (RRM1) et deux copies de la sous-unité régulatrice R2 (au choix entre RRM2 et RRM2b). R2 est régulée de façon cyclique avec un pic lors de la phase S. De façon intéressante, les cellules présentant des lésions de l'ADN lors de la phase S présentent une surexpression de RRM2b (Mathews, 2015) (**Figures 24 & 25**).

Les dommages de l'ADN. La présence de cassures ou de lésions de l'ADN résultant de sources endogènes ou exogènes peuvent également être la cause d'un stress de réplication. La modifications des bases peut, en effet, représenter une barrière physique aux complexes de réplication (Zeman and Cimprich, 2014). Les ROS sont un acteur important conduisant au stress de réplication notamment suite à l'oxydation de l'ADN mais également du pool de dNTPs. L'étude de Wilhelm et al., montre que des cellules déficientes pour la recombinaison homologue présentent un stress de réplication associé à un fort niveau de ROS cellulaire et de foci γ H2AX. L'ajout d'un antioxydant rétablit une réplication normale sans dommages de l'ADN, alors que l'ajout de H_2O_2 (médiateur de ROS) réduit fortement la vitesse des fourches. De façon surprenante, l'ajout de précurseurs de dNTPs à des cellules déjà traitées par de l' H_2O_2 est suffisant pour empêcher l'installation d'un stress de réplication (Wilhelm et al., 2016). Les aldéhydes, produits du métabolisme de l'alcool ou de la déméthylation des histones, peuvent également générer des crosslinks inter-brins d'ADN ou ADN-protéines (Fragkos and Naim, 2017).

L'activation d'oncogènes. L'activation d'oncogènes peut perturber l'aspect temporel de la réplication en jouant sur l'initiation et la progression des fourches de réplication (Kotsantis et al., 2018). L'un des exemples les mieux caractérisés est celui de la sénescence induite par l'oncogène Ras. L'étude de Di Micco et al., montre que le DDR (ATM, CHK2, p53, p21, p16) est activé immédiatement après l'expression de l'oncogène Ras dans des cellules fibroblastiques humaines et conduit à une sénescence cellulaire et donc un arrêt de prolifération (Di Micco et al., 2006). Lorsque le DDR est inhibé (inhibition d'un des acteurs du DDR comme CHK2), les cellules rentrent alors dans une phase hyper-répllicative dans laquelle les origines de réplication sont initiées à de nombreuses reprises. A partir de xénogreffes de cellules mutées pour *CHK2*, les auteurs montrent que l'activation de Ras induit une augmentation du nombre de réplicons ainsi que des altérations de la vitesse de progression des fourches.

Les drogues. La réplication de l'ADN est un processus biologique fondamental qui, une fois dérégulée, peut conduire à de l'instabilité génomique. Celle-ci est l'une des caractéristiques principales du cancer et confère aux tumeurs une diversité génétique permettant son évolution. Le cancer est aussi caractérisé par sa forte capacité proliférative. Ainsi, depuis de nombreuses années, beaucoup d'études se sont intéressées à cibler la dynamique de la

réplication afin d'induire un stress de réplication. Cette propriété a même été décrite comme étant le talon d'Achille de la cellule cancéreuse (Kitao et al., 2018). Ainsi, il existe aujourd'hui une pléthore de médicaments anti-cancéreux capables de provoquer un stress de réplication sur une cellule à forte capacité de division. Par exemple, l'aphidicoline et la camptothécine, qui sont respectivement, des inhibiteurs des ADN polymérase de la famille B et de la topoisomérase I, sont utilisés en thérapie (Fragkos and Naim, 2017). L'hydroxyurée (HU) a été l'une des premières drogues utilisées afin de combattre les tumeurs solides et les syndromes myéloprolifératifs, caractérisés par une production anormale d'allure cancéreuse de certaines cellules sanguines. En 1967, son autorisation de mise sur le marché aux États-Unis permettait de lutter contre le mélanome, le carcinome ovarien ainsi que les cancers de la tête et du cou (Bethesda, 2012). L'action du HU est aujourd'hui bien caractérisée. La molécule provoque une diminution de la vitesse de réplication de par son action inhibitrice sur l'activité de l'enzyme RNR. Ainsi, une déplétion en dNTPs se produit, ne permettant pas d'assurer une réplication correcte. L'action du HU permet de bloquer les cellules cancéreuses dans le cycle de façon permanente et entraîne de plus l'accumulation de ROS, ce qui conduit à l'activation du DDR et leur mort (Singh and Xu, 2016).

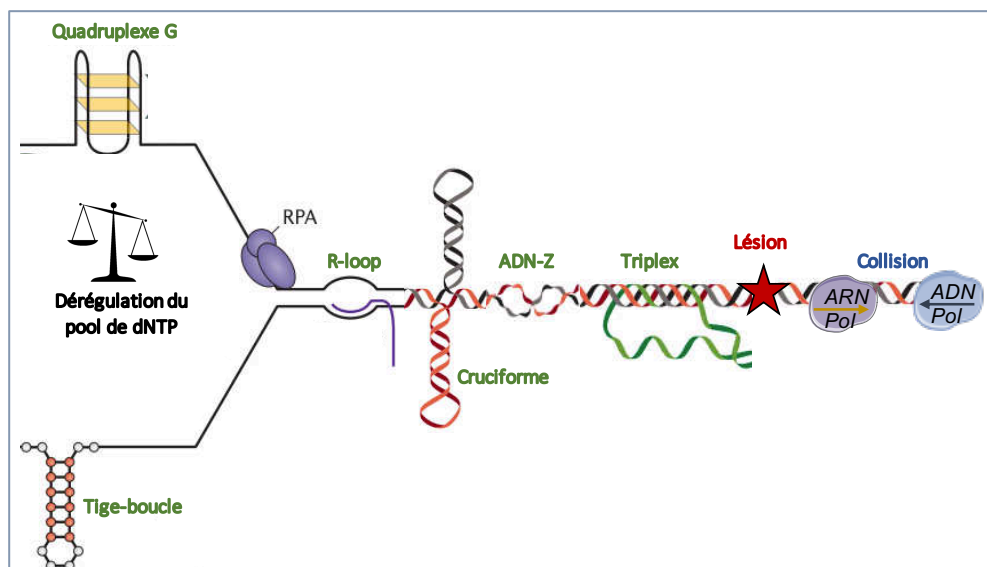


FIGURE 24. LES CAUSES D'UN STRESS DE REPLICATION

Représentation schématique montrant des anomalies structurales (en vert), la collision entre les machineries (en bleu), la présence de lésions (en rouge) ou encore la dérégulation du pool de dNTPs, responsables d'un stress de réplication. Adapté de (Técher et al., 2017).

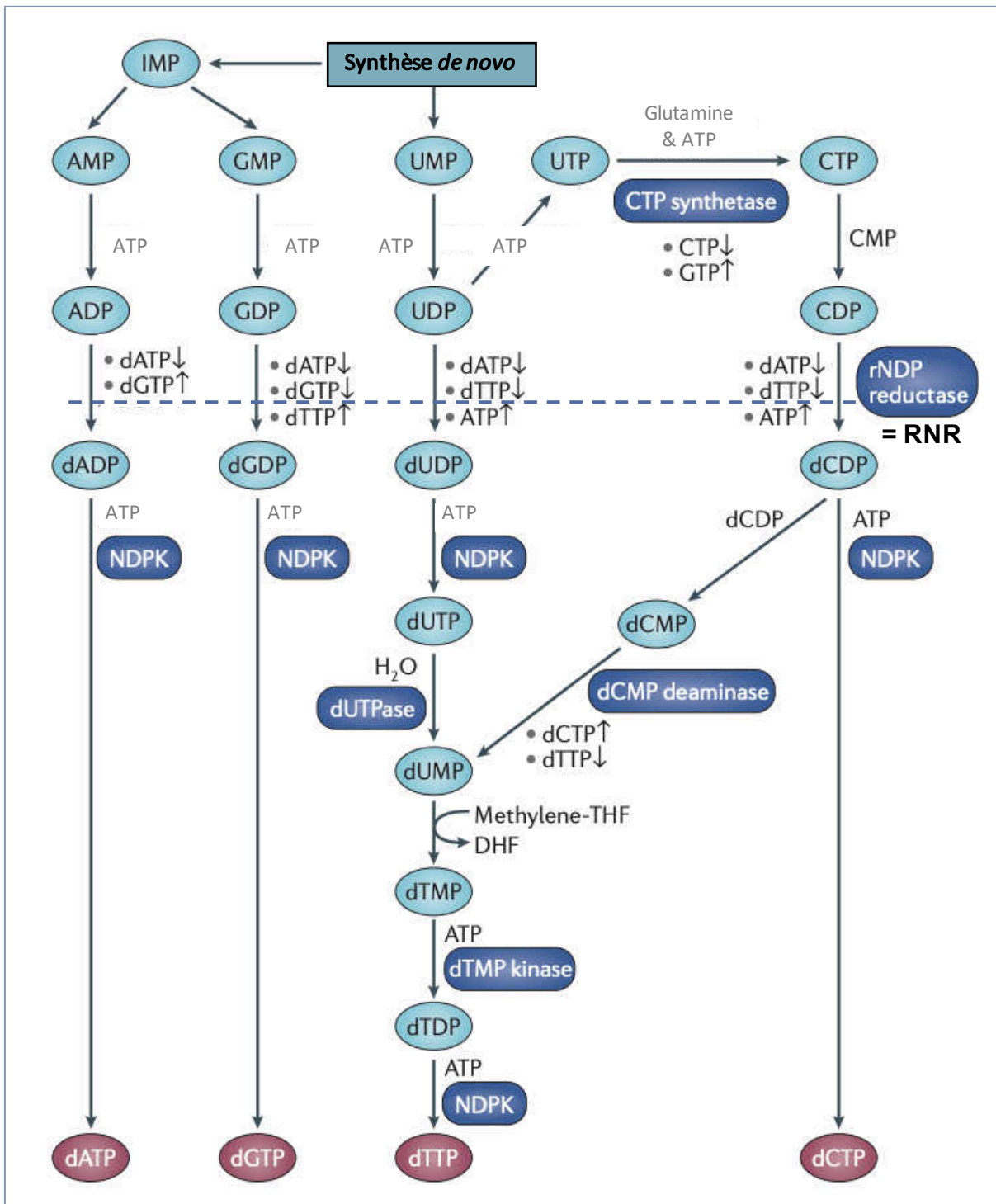


FIGURE 25. VOIES DE SYNTHÈSE DES DNTPS

Représentation schématique des voies de synthèse. L'enzyme limitante, RNR, permet la conversion des NDPs en dNDPs. Adapté de (Mathews, 2015).

1.4.5 Conséquences d'un stress de réplication

Le stress de réplication est reconnu comme un problème pouvant porter atteinte à la stabilité génomique et la survie cellulaire. Moléculairement, il prend place lorsque l'hélicase continue d'ouvrir la molécule d'ADN, en aval, alors que la polymérase est arrêtée ou ralentie, en amont. Cela génère ainsi des portions d'ADN simple-brin (ssDNA) qui sont immédiatement fixées par les complexes RPA et qui persistent dans le temps. Ils servent de plateforme de recrutement aux complexes ATRIP/ATR, qui empêchent alors un collapse des fourches sur l'ADN et ainsi la genèse de cassures double-brin (Gaillard et al., 2015). Ce phénomène est largement dépendant de la quantité de protéines RPA disponibles. L'exhaustion de RPA conduit notamment à une catastrophe réplivative provoquant des effondrements à de nombreux endroits et une pulvérisation des chromosomes (Toledo et al., 2017). Les deux marqueurs importants de la cascade de phosphorylation induite par ATR sont RPA (Ser 33) et **CH**eckpoint **K**inase **1** (CHK1-Ser 345). ATR jugule le stress par de nombreuses actions : **(1)** en arrêtant le cycle cellulaire (via la phosphorylation de CHK1), **(2)** en supprimant l'initiation des origines de réplication tardives (via la voie de Fanconi et l'inhibition des CDK), **(3)** en stabilisant et redémarrant les fourches arrêtées (via RPA), et, **(4)** en supprimant la recombinaison homologue (Zeman and Cimprich, 2014). ATR régule aussi la disponibilité des dNTPs en permettant la surexpression de RRM2 (Blackford and Jackson, 2017).

La voie de Fanconi permet de diminuer la vitesse de polymérisation des fourches (par ubiquitylation de FANCD2) afin de restreindre l'accumulation de ssDNA et l'exhaustion de RPA. Aussi l'activation de FANCI inhibe l'initiation des origines de réplication dormantes (Nepal et al., 2017). Toutefois, l'activation des origines de réplication dormantes représente une aide essentielle permettant de terminer la réplication afin d'éviter une catastrophe réplivative. De façon générale, c'est la vitesse des fourches qui dicte le nombre d'origines à initier (Técher et al., 2017).

2 Pathologies induites par le stress de réplication et le DDR

Il existe de nombreuses pathologies ayant pour origine des mutations dans les gènes nécessaires à la réplication et à la réparation de l'ADN. De manière globale, les phénotypes retrouvés pour l'ensemble de ces dérégulations sont principalement des syndromes associés à des défauts développementaux, des retards de croissance ainsi que des troubles neurologiques (Mazouzi et al., 2014). Comme il a été déjà évoqué, des mutations dans le gène *ATR*, sont responsables du syndrome de Seckel (O'Driscoll et al., 2003). Le syndrome de Meier-Gorlin est, lui, associé à des mutations des gènes codants les facteurs du complexe de pré-réplication (*ORC1*, *ORC2-6*, *CDT1*, *CDC6*), ce qui a pour conséquence d'affecter l'initiation des origines de réplication (Bicknell et al., 2011). Par ailleurs, des mutations dans les gènes codants des facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine lors de la réplication peuvent également entraîner des complications lors de la réplication. Des mutations des gènes *SMARCAL1* et *ATRX*, sont responsables respectivement de la dysplasie immuno-osseuse de Schimke et de la thalassémie alpha (Boerkoel et al., 2002; Clynes et al., 2014). L'anémie de Fanconi est également bien connue pour être la représentation phénotypique de différentes mutations retrouvées dans les gènes *FANC*, essentiels pour la réparation de l'ADN et le maintien de la réplication. Les patients atteints de cette pathologie souffrent principalement d'anomalies développementales mais présentent également une susceptibilité au cancer, notamment des tissus présentant de forts taux de prolifération (Tischkowitz and Dokal, 2004).

De façon intéressante, certains patients atteints de maladies auto-immunes rhumatoïdes montrent au niveau sérique la présence d'autoanticorps ciblant certaines protéines du DDR comme Ku et DNA-PK (Schild-Poulter et al., 2008). Ces résultats suggèrent que la présence de dommages de l'ADN est une étape importante dans le développement de réponses auto-immunes. Récemment, de nombreuses études se sont intéressées à mieux comprendre le syndrome d'Aicardi-Goutières (SAG) caractérisé par des dérégulations neurologiques sévères et l'installation d'une inflammation congénitale comme le lupus systémique érythémateux associé à une interféronopathie de type I (Crow and Rehwinkel, 2009). Le SAG est une maladie génétique qui peut être causée par des mutations dans l'un des cinq gènes codants les protéines suivantes : L'exonucléase 3'→5' TREX, l'une des trois protéines du complexe de l'endonucléase RNASEH2, et la dNTPase SAMHD1 (Crow et al., 2006b, 2006a; Rice et al., 2009). L'endonucléase RNASEH2 dégrade les hybrides ARN/ARN afin d'éviter certains conflits lors de la réplication avec la machinerie de transcription (Pokatayev et al.,

2016). De façon très intéressante, la protéine TREX est impliquée dans la dégradation de l'ADN nucléaire retrouvé au niveau cytoplasmique (Yang et al., 2007). La protéine SAMHD1, en collaboration avec l'endonucléase MRE11, est elle aussi impliquée dans la dégradation de fragments d'ADN, retrouvés libres au niveau du noyau lorsque les fourches de réplication sont bloquées (Coquel et al., 2018). L'étude montre également que TREX et SAMHD1 agissent de concert pour éviter l'activation de la voie senseur d'ADN cGAS-STING, induisant la production d'interférons de type I (IFN). Récemment, une étude a mis en lumière qu'un stress de réplication se produit dans les cellules souches de la peau et est associé à l'émergence d'une affection cutanée inflammatoire chronique, l'hydradénite suppurée (aussi appelée acné inversée) (Orvain et al., 2020). En effet, les cellules souches des follicules pileux isolées de patients montrent une accélération de la vitesse de réplication associée à l'activation des acteurs du DDR (ATR/CHK1). Cela entraîne la formation de micronoyaux et la présence d'ADN nucléaire au niveau du cytoplasme amenant à l'activation de la voie cGAS-STING et la production d'IFN de type I. Nous reviendrons dans le prochain chapitre sur la caractérisation de cette voie senseur d'ADN.

3 Dommages de l'ADN et activation du DDR dans la NAFLD

3.1 Comprendre le mécanisme grâce aux modèles murins

La présence de dommages de l'ADN dans la NAFLD est largement rapportée. La lipotoxicité à travers les dysfonctions mitochondriales, la genèse d'un stress oxydant et l'accumulation de ROS sont des éléments induisant des lésions de l'ADN. En effet, l'apport d'antioxydants permet de réduire significativement les dommages de l'ADN au niveau hépatique. Dans un modèle murin HFD, la vitamine E réduit la présence de DSB hépatiques (Remely et al., 2017). De la même façon, la mise sous restriction calorique de rats obèses (rats Zucker) ou l'induction d'un by-pass gastrique conduit à la diminution du stress oxydant et des dommages de l'ADN au niveau hépatique (Bankoglu et al., 2016). En parallèle, le laboratoire a montré que la mise sous antioxydants de souris obèses (HFD, MCD, etc...) ne permet pas la genèse du contingent polyploïde pathologique, provoqué par l'activation du DDR (Gentric et al., 2015b). Bien que les mécanismes liant les ROS aux dommages de l'ADN soient maintenant largement rapportés, le rôle des protéines du DDR dans la NAFLD reste discuté.

L'étude de Daugherty et al., montre que la présence d'ADN oxydé par la présence du marqueur 8-OHdG (**8-hydroxydeoxyguanosine**) est associée à la phosphorylation d'ATM chez les souris HFD sans trop d'accumulation de γ H2AX. La déficience d'ATM dans ce modèle permet de diminuer l'apoptose hépatocytaire et la fibrose (Daugherty et al., 2012). Dans cette étude, le rôle d'ATM n'est pas clairement associé à la présence de dommages de l'ADN mais plutôt à la présence des ROS. De façon intéressante, il a été montré que la protéine ATM disposerait de domaines de reconnaissance des ROS, ce qui conduirait à son activation (Guo et al., 2010). Le rôle de cette protéine apparaît donc essentiel dans la NAFLD aussi bien dans le contrôle des ROS que des dommages de l'ADN. Notamment, l'injection de DEN à des souris ATM^{+/-} entraînent le développement de CHC à 1 an alors que les souris ATM^{-/-} sont réfractaires à la tumorigenèse (Teoh et al., 2010). Ces dernières présentent en fait une activation de p53 relayée par l'activation d'ATR et de CHK1 qui provoquent l'arrêt du cycle cellulaire et la mise en sénescence des cellules mutées. A l'inverse, lorsque la protéine ATM est présente, ATR n'est pas exprimée et les cellules vont alors présenter une importante instabilité chromosomique (Teoh et al., 2010). La mise en place du DDR, en fonction de la lésion mais également du senseur activé, semble agir comme une arme à double tranchant dans la NAFLD et le CHC. Toujours dans le modèle DEN, le NHEJ semble être un frein précoce contre la carcinogenèse hépatique. Chez la souris, la défaillance du NHEJ (Ku70^{-/-}) participe à la déstabilisation des points de contrôle du cycle cellulaire et provoque une instabilité chromosomique accélérant la carcinogenèse. Les CHC présentent notamment un nombre important d'aberrations structurales et numériques des chromosomes ainsi qu'une prolifération accrue due à une surexpression de la cycline D1, de PCNA et d'ATM et une dégradation continue de p53 (Teoh et al., 2008).

La surexpression d'oncogènes, chez la souris, est un phénomène promoteur de la carcinogenèse hépatique, bien qu'elle ne soit que peu représentée dans la carcinogenèse hépatique humaine. Cependant, elle permet d'étudier les mécanismes moléculaires conduisant à la tumorigenèse. La surexpression des URI (unconventional prefoldin RBP5 interaction) chez la souris, conduit dès les premières semaines au développement de nodules dysplasiques, ressemblant histologiquement à ceux retrouvés lors d'hépatites humaines (Tummala et al., 2014). A un an, les souris développent des CHC différenciés hautement prolifératifs. Dès huit semaines, le foie montre une prolifération compensatoire associée à la présence de dommages de l'ADN (phosphorylation d'H2AX, RPA et CHK1) et l'activation de p53 suggérant un stress de

réplication et la présence de cassures simple-brin de l'ADN. Dans ce modèle particulier, le stress oxydant n'est pas l'acteur principal responsable de l'activation du DDR. Des analyses ingenuity® de RNAseq montrent une modification de la voie de synthèse *de novo* du NAD⁺ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) via la diminution de la voie du catabolisme du L-Tryptophane. Le NAD⁺ est un métabolite important pour la réparation des dommages de l'ADN. Dans ce contexte, les systèmes de réparation sont moins efficaces ce qui conduit à l'accumulation de dommages de l'ADN. Cette balance est inversée lorsqu'un précurseur du NAD⁺, le Nicotinamide riboside, est ajouté dans la nourriture des souris. Celui-ci permet de restaurer l'apport en NAD⁺ et protège le foie de la présence de dommages de l'ADN et l'apparition des lésions préneoplasiques ainsi que le développement tumoral (Tummala et al., 2014). De façon intéressante, l'homéostasie du NAD⁺ est dérégulée lors de la NAFLD (Katsyuba et al., 2020). Des études menées sur des modèles murins de régime HFD (Yoshino et al., 2011), HFHS (Gariani et al., 2016), MCD (Gariani et al., 2017), etc... montrent qu'une diminution du NAD⁺ se produit lors de la stéatose de par une diminution de l'expression des enzymes de la voie de biosynthèse du NAD⁺ (NAMPT) et l'utilisation du NAD⁺ par les enzymes comme les sirtuines (désacétylation des protéines) ou PARP (PARylation et réparation de l'ADN). L'ensemble de ces études montre que la restauration du pool de NAD⁺ à l'aide de précurseurs ou d'inhibiteurs des enzymes consommatrices, diminue la stéatose, la résistance à l'insuline et réduit le stress oxydant et celui du RE. Elles mettent en lumière le crosstalk qui existe entre dérégulations métaboliques et lésions de l'ADN. De plus, l'induction de DSB dans le foie normal, à l'aide d'une enzyme de restriction, conduit à un phénotype de vieillissement accéléré et la présence d'infiltrats inflammatoires. Un mois après l'induction des cassures, un phénomène de prolifération compensatoire se met en place et est suivi par la mise en sénescence du tissu, sans apparition de tumeurs (White et al., 2015). Ici, l'absence de dérégulations métaboliques semble être protecteur face aux événements pro-carcinogènes initiés par les DSB. Ainsi, il apparaît que les dysfonctions métaboliques retrouvées dans la NAFLD soient promotrices de la carcinogénèse.

3.2 Chez le patient NAFLD

Il est maintenant bien rapporté que les hépatocytes de patients NASH présentent une oxydation de l'ADN (8-OHdG), notamment corrélée à la présence du stress oxydant (Seki et al., 2002). Les patients NASH ayant développé un CHC présentent un niveau de 8-OHdG deux fois plus important que les patients NASH sans CHC, au niveau des hépatocytes du tissu non tumoral. Cela démontre bien que le niveau d'oxydation de l'ADN est un facteur prédictif de l'évolution de la pathologie (Tanaka et al., 2013). De plus, cette oxydation est associée à la méthylation de gènes suppresseurs de tumeurs (HIC1, GSTP1, SOCS1, RASSF1, CDKN2A, et APC) et représente donc un risque supplémentaire de développer un CHC (Nishida et al., 2016). Outre la présence d'ADN oxydé, il a été rapporté une autre modification de l'ADN appelée ϵ DA (exocyclic-DNA adducts like 1,N(6)-etheno-2'-deoxyadenosine) chez des patients NASH (Linhart et al., 2015). Il s'agit d'une modification des bases (A, C, methyl-C et G) suite à une réaction avec le 4-HNE (4-hydroxynonenal) fortement carcinogène. L'étude montre que ces adduits de l'ADN peuvent servir de marqueurs prédictifs de la NASH vers le CHC (Teufel et al., 2015).

Par ailleurs, comme il a été expliqué, les télomères sont associés à un état de sénescence hépatocytaire dans la NAFLD. Une étude menée chez des patients a montré qu'il existe deux types de patients au regard de la taille de leurs télomères : Ceux ayant une taille normale, et ceux ayant une taille fortement diminuée. Ce deuxième groupe présente notamment une stéatose et un niveau de 8-OHdG plus élevés (Nakajima et al., 2006).

Dans cette troisième partie, nous avons défini la voie de réponse aux dommages de l'ADN (DDR) ainsi que les trois acteurs protéiques principaux (ATM, ATR et DNA-PK) qui permettent l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation lors de dommages de l'ADN. Il a également été expliqué la notion de stress de réplication, qui, peut-être généré suite à des erreurs moléculaires d'origines physiologiques, la présence d'oncogènes ou la présence de médicaments. Il existe de nombreuses pathologies ayant pour origine des mutations dans les gènes nécessaires à la réplication et à la réparation de l'ADN. Certaines de ces maladies font état d'une interféronopathie de type I très généralement associée à l'activation d'une voie senseur d'ADN, cGAS-STING.

La présence de dommages de l'ADN dans la NAFLD est largement rapportée. La lipotoxicité à travers les dysfonctions mitochondriales, la genèse d'un stress oxydant et l'accumulation de ROS sont des éléments induisant des lésions de l'ADN. Les patients NASH montrent notamment un fort niveau d'oxydation de l'ADN associé à la présence de lésions de l'ADN. Ce niveau d'oxydation de l'ADN est deux fois plus important chez ces patients ayant développé un CHC. Cela suggère que la présence de cellules endommagées au niveau de leur ADN est un facteur important dans l'évolution de la pathologie.

IV. La voie cGAS/STING

Chez les eucaryotes, le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire est assuré par une batterie de « senseurs », capables de reconnaître et transmettre d'éventuels dangers. Une étape cruciale dans le maintien de cet équilibre relève de la communication du stress aux autres cellules environnantes, qu'elles soient parenchymateuses ou immunitaires. La plus grande menace réside généralement en la présence de pathogènes unicellulaires tels que les virus et bactéries. Cependant, il est maintenant bien rapporté que même ces organismes unicellulaires sont capables de se défendre face à d'autres pathogènes. L'exemple le plus décrit est la défense microbienne face à des virus (bactériophages) par le système CRISPR/Cas9. Chez les eucaryotes, ces senseurs sont regroupés dans la famille des PRR (**P**attern **R**ecognition **R**eceptor) et permettent : **(1)** De reconnaître un danger, **(2)** De donner l'alerte et **(3)** D'initier une réponse cellulaire telle que la survie, la sénescence, la mort et/ou une réponse immunitaire. Certains de ces senseurs reconnaissent la présence d'acides nucléiques exogènes reflétant la présence d'un pathogène dans le cytoplasme. D'autres, reconnaissent la présence d'acides nucléiques endogènes hors des compartiments spécifiques, témoignant de la présence d'un dysfonctionnement ([Vanpouille-Box et al., 2018](#)).

1 La voie senseur d'ADN : cGAS-STING

L'étude de la voie senseur d'ADN cGAS-STING est en plein essor. D'abord caractérisée comme une voie de reconnaissance des pathogènes, son activation est maintenant étudiée dans les maladies auto-inflammatoires ainsi que le cancer. Ces dernières années, son implication dans la NAFLD a également été étudiée, et semble être promoteur de la pathogenèse.

1.1 Les acteurs de la voie

La protéine STING (**Stimulator of INterferon Genes**) aussi appelée TMEM173 (**TransMEMbrane protein 173**) a été découverte en 2008, par deux études indépendantes visant à découvrir des ARNs impliqués dans la réponse antivirale ([Ishikawa and Barber, 2008](#); [Zhong et al., 2008](#)). STING est exprimé dans de nombreux types cellulaires notamment dans les cellules hématopoïétiques comme les lymphocytes T, les macrophages et les cellules dendritiques et permet d'initier une réponse transcriptionnelle des gènes de l'immunité innée en réponse à différents stimuli pathogéniques (virus, bactéries et ADN transfecté) via les protéines NF- κ B et IRF3 (**Interferon Regulatory Factor 3**) ([Ishikawa and Barber, 2008](#); [Ishikawa et al., 2009](#)). STING est activé suite à la fixation d'acides nucléiques particuliers, des dinucléotides cycliques, généralement retrouvés conservés chez les bactéries, ce qui active la protéine TBK1 (**TANK-Binding Kinase 1**) ([Burdette et al., 2011](#)).

Ce n'est qu'en 2013, que le deuxième acteur principal de la voie est découvert : La nucléotidyle transférase **cyclic GMP-AMP Synthase** cGAS (MB21D1) ([Sun et al., 2013](#)). Il s'agit d'un senseur d'ADN cytosolique capable de fixer directement des fragments d'ADN, de 20 à 45 pb. Lorsque le fragment est lié, la conformation protéique de cGAS est modifiée, ce qui déclenche son activité enzymatique, consistant en la transformation de GTP et ATP en cGAMP (**cyclic GMP-AMP**), un dinucléotide cyclique ([Civril et al., 2013](#)). La molécule cGAMP peut fixer deux molécules STING, ce qui induit une oligomérisation de cette dernière. STING oligomérisé peut alors transiter dans l'appareil de Golgi où il sera palmitoylé et finalement activé ([Cai et al., 2014](#); [Gao et al., 2013b](#)). Ce processus permet son interaction avec TBK1, qui contrôle la protéine IRF3. STING, TBK1 et IRF3 forment un complexe temporaire et temporel dans lequel TBK1 phosphoryle STING au niveau C-terminal afin d'ancrer IRF3 ([Saitoh et al., 2009](#)). Celui-ci est à son tour phosphorylé par TBK1. IRF3 se dimérise et migre dans le noyau pour induire la

transcription de l'interféron β (IFN β). L'IFN β excrété peut alors se fixer aux récepteurs IFNAR (IFN α Receptor) de la cellule (signal autocrine) qui conduit à l'activation de la voie JAK/STAT et à l'induction de la transcription de plusieurs ISG (Interferon-Stimulated Gene) prévenant la réplication, l'assemblage et la libération des virus (Barber, 2015) (Figures 26). De façon intéressante, lorsque cGAS est activée, les protéines se transforment en mini-réacteurs producteurs de cGAMP. Les protéines cGAS se concentrent sous forme de gouttelettes afin d'augmenter de façon exponentielle la production de ce métabolite (Du and Chen, 2018). Enfin, cGAS intervient aussi dans la reconnaissance des micronoyaux générés lors de mitoses anormales. La rupture de l'enveloppe du micronoyau conduit directement à son activation et la mise en sénescence de la cellule (Dou et al., 2017).

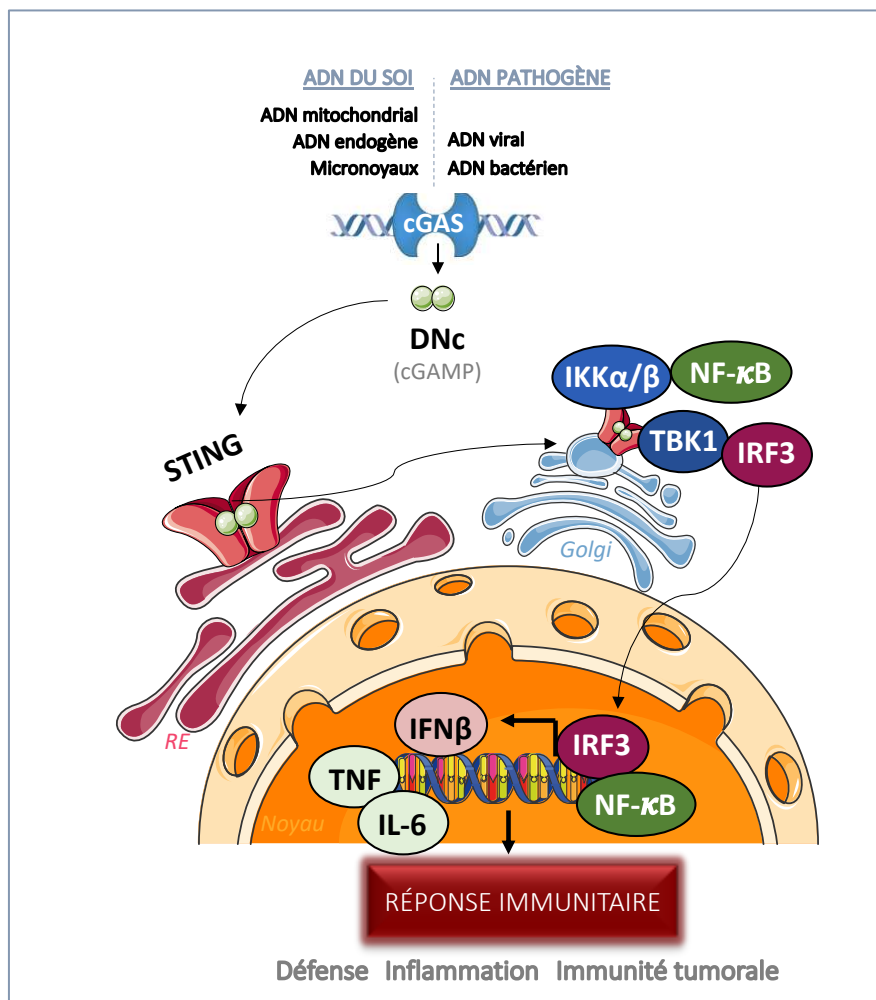


FIGURE 26. LA VOIE cGAS/STING

Représentation schématique de la voie cGAS/STING. cGAS est le senseur d'ADN capable d'activer la protéine transmembranaire STING via l'intermédiaire cGAMP (Dnc : dinucléotide cyclique). STING active alors un programme pro-inflammatoire médié par NF- κ B et IRF3. Adapté de (Motwani et al., 2019).

1.2 Activation de la voie

1.2.1 Par de l'ADN extracellulaire

Comme nous l'avons abordé, cGAS est le senseur de la voie permettant la reconnaissance d'ADN. Il est capable de reconnaître un large panel d'ADN : ADN double et simple-brin, ADN synthétique riche en G, hybride ADN-ARN, etc ..., ayant différentes origines (Hopfner and Hornung, 2020). cGAS reconnaît l'ADN issu des virus à ADN ou des virus à ARN effectuant de la rétrotranscription, comme le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Gao et al., 2013a). La protéine reconnaît également l'ADN de bactéries intracellulaires (Paijo et al., 2016). De plus, ces bactéries produisent un dinucléotide cyclique proche de cGAMP, capable d'activer STING.

La voie peut également être activée par de l'ADN du soi d'origine extracellulaire, ayant comme véhicule des exosomes ou des microvésicules (Diamond et al., 2018). Des études montrent que des cellules tumorales irradiées produisent des exosomes contenant de l'ADN du soi. Ceux-ci sont pris en charge par des cellules dendritiques et induisent la production d'IFN de type I de façon STING-dépendante ainsi que l'expression de marqueurs de co-stimulation des lymphocytes. Cela a pour conséquence d'augmenter l'immunogénicité et de diminuer la carcinogénèse. L'ADN mitochondrial tumoral est également phagocyté par les cellules dendritiques et permet de déclencher une réponse anti-tumorale de façon STING-dépendante (Xu et al., 2017). Enfin, il a été suggéré que les cellules tumorales peuvent libérer cGAMP dans le milieu extracellulaire qui va alors être pris en charge par une cellule voisine non tumorale et produire ainsi des IFN de type I. Ceux-ci sont capables de recruter et d'activer les cellules NK pour freiner la tumorigénèse (Marcus et al., 2018). Cependant le transfert de cGAMP n'a pas encore été complètement élucidé. D'autres études montrent que dans un contexte d'infections virales *in vitro*, ce transfert peut avoir lieu à travers les « gap junctions », la fusion membranaire ou encore des particules virales (Ablasser et al., 2013; Gentili et al., 2015; Xu et al., 2016). Au stade *in vivo*, le transfert de cGAMP des cellules tumorales vers les astrocytes se fait par les « gap junctions », et promeut le développement de métastases cérébrales (Chen et al., 2016a). Très récemment, dans un contexte d'infection viral à l'herpès simplex de type I (Herpes Simplex Virus 1 - HSV-1), il a été montré que cGAMP peut être exporté et importé hors des cellules par un canal anionique sensible au gonflement cellulaire (Volume-Regulated Anion Channels – VRACs), le LRRC8 (Zhou et al., 2020).

1.2.2 Par de l'ADN intracellulaire du soi

La voie cGAS-STING peut être activée par de l'ADN intracellulaire du soi, en provenance de la mitochondrie ou du noyau. Dans ce dernier cas, l'ADN peut être présenté sous forme de micronoyaux ou bien sous forme libre dans le cytosol.

L'apoptose déclenchée par la voie intrinsèque entraîne une perméabilisation de la membrane mitochondriale. Ce phénomène est associé à la libération du cytochrome C et l'activation des caspases qui pourront alors déclencher la mort cellulaire. Bien qu'il ait déjà été montré que la membrane mitochondriale reste intacte lors de l'apoptose, l'étude de Riley et al., montre à l'aide d'une technique d'imagerie de haute résolution que la perméabilisation de la membrane mitochondriale est, dans une fenêtre de temps bien définie, capable de libérer de l'ADN mitochondrial (Riley et al., 2018). Cela corrèle de façon positive avec l'activation de la protéine STING et la production d'IFN de type I. Par ailleurs, une élégante étude sur la maladie de Parkinson a permis de montrer que la fuite de l'ADN mitochondrial dans le cytosol peut aussi activer la voie cGAS-STING (Sliter et al., 2018). Cette pathologie est notamment caractérisée par un niveau élevé de cytokines pro-inflammatoires qui contribue à l'inflammation tissulaire et la perte des neurones dopaminergiques. Des mutations dans les gènes PARKIN et PINK1 sont notamment retrouvées. Ces deux protéines interviennent dans l'élimination des mitochondries endommagées. A l'aide de souris mutées pour ces deux protéines et soumises à une intense activité physique afin d'entraîner un stress mitochondrial, les auteurs montrent que l'inflammation est réduite lorsque les souris présentent une inactivation de STING. L'ADN mitochondrial (ADNm) est retrouvé au niveau sérique et, est associé à la production de cGAMP. Dans un modèle de dégénération plus sévère, la suppression de STING entraîne une disparation du phénotype inflammatoire et de la neurodégénération.

De façon générale, la formation d'un micronoyau intervient suite à la présence de dommages de l'ADN nucléaire lors de la mitose. Les portions d'ADN endommagées sont regroupées puis encapsulées dans une membrane péri-nucléaire, créant *de facto* de l'instabilité chromosomique. cGAS est l'acteur principal de surveillance de ces structures, et peut co-localiser avec le marqueur de dommages de l'ADN, γ H2AX, au sein du micronoyau mais également au niveau de l'ADN nucléaire (Hopfner and Hornung, 2020). L'exposition à des composés chimiques anti-tumoraux (cisplatine et étoposide) ainsi que l'irradiation peuvent induire la formation de micronoyaux et l'activation de la voie cGAS/STING (Motwani et al., 2019). L'activation de la voie est notamment très étudiée dans les cancers et montre des effets

différents en fonction des caractéristiques tumorales. L'étude de Bakhoun et al., met en évidence chez des patients présentant un carcinome épidermoïde de la tête ou du cou, que les métastases tumorales cérébrales possèdent plus d'instabilité chromosomique (Chromosomal INstability - CIN) que la tumeur primaire (Bakhoun et al., 2018). Les auteurs comparent les caractéristiques phénotypiques et moléculaires de tumeurs ayant une faible ou une forte CIN dans un modèle murin d'injections intracardiaques de cellules tumorales. Celles présentant une forte CIN présentent une tumorigenèse plus grave associée à un fort nombre de micronoyaux et une activation de la voie cGAS-STING. De façon intéressante, la tumeur primaire ne présente que peu de CIN et une absence d'activation de la voie cGAS/STING.

Enfin, comme nous l'avons déjà évoqué dans la partie précédente, le stress de réplication peut conduire à l'activation de la voie senseur d'ADN cGAS-STING. Certaines pathologies regroupées sous le terme d'« interféronopathies » font état d'une sur-activation de la voie et de la production excessive d'IFN de type I. C'est le cas des patients souffrant du syndrome d'Aicardi-Goutières, dont les patients présentent des niveaux d'IFN de type I très élevés dans le sang et le fluide cérébrospinal. Des mutations sont retrouvées dans le gène de la DNase *TREX1*, de RNases ou encore de la dNTPase *SAMHD1* (Crow and Manel, 2015). Dans ce syndrome, c'est l'accumulation d'ADN nucléaire endogène, au niveau cytosolique, qui conduit à la sur-activation de la voie cGAS/STING. Cet ADN a pour origine des produits issus de la réplication ou de la réparation de l'ADN (Coquel et al., 2018; Crow and Manel, 2015). Plusieurs études ont montré que des cellules humaines mutées pour *TREX* ou *SAMHD1*, présentent un stress de réplication et accumulent en conséquence de l'ADN simple-brin néorépliqué (Coquel et al., 2018; Wolf et al., 2016). Ce produit de réplication aberrant s'accumule au niveau nucléaire et est ensuite exporté dans le cytosol. S'ils ne sont pas dégradés à temps par la DNase TREX, ils peuvent se fixer à cGAS et activer la voie (Figures 27).

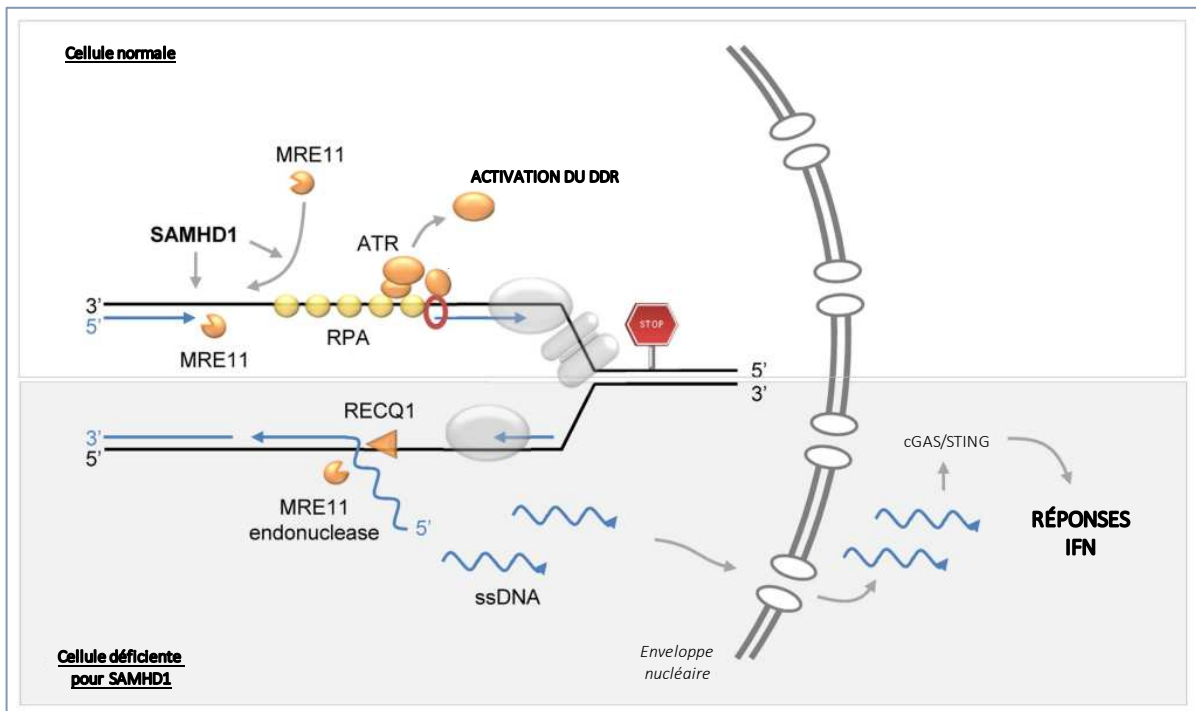


FIGURE 27. LA DÉFICIENCE DE SAMHD1 CONDUIT À L'ACTIVATION DE LA VOIE cGAS/STING

Illustration du phénomène. Lors d'un stress de réplication, la trop grande quantité de protéines RPA fixées sur l'ADN simple-brin en attente de réplication conduit à l'activation de la protéine ATR, qui va alors activer le DDR. La protéine SAMHD1, agit de concert avec l'exonucléase MRE11 afin d'éliminer l'ADN néorépliqué proche du site endommagé. Ce phénomène est important pour le recrutement des protéines RPA sur l'ADN, et est donc nécessaire à l'activation du DDR par ATR. Ces interactions moléculaires permettent de réinitialiser la fourche de réplication et d'induire une réparation de l'ADN par TopBP1 et le complexe 9-1-1 (Rad9–Hus1–Rad1). Lorsque la protéine SAMHD1 n'est pas présente, l'ADN néorépliqué est déplacé par l'hélicase RECQ1 puis clivé par l'endonucléase MRE11. Cela a pour conséquence la libération de fragments d'ADN dans le noyau, qui sont alors libérés dans le cytoplasme et capables d'activer la voie cGAS-STING. Adapté de (Coquel et al., 2018).

2.1 Activation dans le tissu adipeux

Dans le tissu adipeux, l'activation de la voie de signalisation cGAS-STING participe à l'installation d'une inflammation stérile chronique et au développement de la NAFLD. L'étude de Bai et al, montre notamment que la voie cGAS-STING-TBK1-NF- κ B-IRF3 est activée chez des souris sous régime HFD, dans les adipocytes et les macrophages du tissu, à la suite d'un stress mitochondrial libérant l'ADNm dans le cytosol (Bai et al., 2017). De plus, les souris *Tbk1^{KO}* sous HFD ne montrent pas d'insulino-résistance et de prise de poids. Cet effet semble principalement dû à une installation plus faible de la pathologie au niveau adipeux (Cruz et al., 2018; Reilly et al., 2015). L'essai clinique (NCT 01842282) a montré sur six patients obèses et diabétiques qu'un traitement de trois mois avec l'amlexanox, un inhibiteur d'IKK ϵ et de TBK1, exerce des effets protecteurs face aux effets métaboliques néfastes (Oral et al., 2017). Les patients traités présentent une amélioration de l'insulino-résistance (réduction de la glycémie et de l'insulinémie en période postprandiale) ainsi qu'une réduction du taux d'acides gras libres plasmatiques. A partir de biopsies du tissu adipeux pré- et post-traitement, les auteurs de l'étude montrent que les patients présentent un profil d'expression génique différent, associé à une reprise de l'activité du tissu adipeux brun (expression de FGF21) et blanc (expression d'ADIPOQ et IL4). Cependant, l'étude ne discute pas de l'inhibition de la voie cGAS-STING et montre même une augmentation de l'inflammation au niveau du tissu adipeux.

2.2 Activation dans le tissu hépatique

Des analyses par séquençage de l'ARN (RNAseq) sur du foie total de souris saines ou NASH (soumises à un régime HFHS + 2% cholestérol ou MCD) montrent une forte expression des gènes de la voie senseur d'ADN (Xiong et al., 2019). Les auteurs montrent que l'expression des gènes *cGas* et *Sting* sont respectivement augmentés par cinq et deux, et que celle des gènes consécutifs à l'activation de la voie sont augmentés d'un facteur trois (*Isg15*, *Ifit1*, *Ifit3*, etc...). Ces derniers sont également retrouvés augmentés chez le patient NASH. Cependant, ce type d'étude à large échelle ne permet pas de discriminer l'activation de la voie au niveau des différentes populations cellulaires.

2.2.1 Activation dans les macrophages hépatiques

Il existe deux principales études ayant décrit le rôle de STING dans la NAFLD. Toutes deux utilisent le modèle murin **STING** golden-ticket (STING^{gt}), dans lequel le gène *Tmem173* (*Sting*) possède une mutation non-sens (T596A) au niveau de l'exon 6 du gène ayant pour résultat une substitution isoleucine-asparagine (I199N) entraînant l'absence de la protéine dans tous les types cellulaires (Sauer et al., 2011).

La première étude a permis d'analyser l'implication de STING dans la stéatose et la NASH par la mise sous régime des souris STING^{gt} : HFD ou MCD. De façon intéressante, les souris STING^{gt} après 6 mois de régime HFD ne présentent pas d'élévation de leur masse pondérale (25g STING^{gt} vs 27g contrôles). Lorsqu'elles sont soumises à un régime MCD, ces souris montrent une diminution significative de la NASH avec une stéatose, une inflammation (TNF- α et IL-6) et une fibrose diminuée comparativement aux souris exprimant la protéine STING (Yu et al., 2019). Dans les deux régimes, les transaminases, les triglycérides et le cholestérol hépatiques sont diminués en absence de STING, notamment due à une diminution de l'expression des gènes de la lipogenèse hépatique (SREBP1c, FAS et CD36). De façon curieuse, les gènes des IFN de type I (IFN- α and IFN- β) ne présentent pas de modification d'expression dans les souris STING^{gt}. Outre l'effet associé au tissu adipeux, les auteurs montrent que les cellules de Kupffer expriment la protéine STING, ce qui n'est pas le cas des hépatocytes. La suppression de STING suffit d'ailleurs à diminuer le marqueur F4/80 au niveau hépatique dans les modèles HFD et MCD, suggérant un rôle important du macrophage hépatique dans la mise en place de la NASH induite de façon STING-dépendante. De façon intéressante, l'activation de STING par le DMXAA (5,6-DiMethylXanthenone-4-Acetic Acid) chez des souris sous régime standard permet l'installation d'une stéatose et d'une inflammation. D'un point de vue moléculaire, c'est la libération d'ADN mitochondrial par les hépatocytes qui provoque l'activation des cellules de Kupffer de façon STING-dépendante, qui produisent alors du TNF- α et de l'IL-6 (Yu et al., 2019). L'ADN mitochondrial est notamment excrété dans le plasma de patients NASH via des microparticules provenant des hépatocytes. Celles-ci conduisent également à l'activation du TLR9 au niveau des endosomes de la cellule de Kupffer, qui produit alors ces cytokines (TNF- α et IL-6) sans production d'IFN de type I (Garcia-Martinez et al., 2016).

La deuxième étude montre sur des coupes de tissus hépatiques, chez le patient stéatosique, que l'expression de STING se fait de façon exclusive au niveau des cellules immunitaires, notamment des cellules macrophagiques, et des cellules endothéliales (Luo et

al., 2018). Les souris STING^{gt} soumises un régime HFD durant douze semaines montrent les mêmes caractéristiques que l'étude précédente. Cependant, afin de confirmer que les phénotypes observés sont principalement dus à la diminution d'activité du macrophage, les auteurs transplantent des moelles osseuses de souris STING^{gt} dans des souris irradiées contrôles. Ainsi, ces souris expriment STING au niveau de l'ensemble des tissus excepté au niveau des cellules myéloïdes. Après douze semaines de régime HFD, ces souris montrent une diminution de la sévérité de la NAFLD associée à une meilleure sensibilité à l'insuline, moins de dommages hépatiques (moins de transaminases hépatiques) et moins de triglycérides plasmatiques, bien que les souris aient une corpulence identique. Au niveau tissulaire, ces souris présentent une stéatose et une inflammation diminuée. A l'inverse, l'expression de STING uniquement au niveau des cellules myéloïdes aggrave la NAFLD induite par un régime HFD. Par la suite, les auteurs montrent que l'ajout de milieu conditionné de macrophages stimulés avec le DMXAA, sur des hépatocytes primaires en culture, induit une réponse pro-inflammatoire en réponse au LPS (TNF α , IL-1 β et IL-6) ainsi que l'augmentation de l'expression de gènes de la lipogenèse (ACC1, FAS et SREBP1c) et de la fibrose (TGF β 1 et fibronectine). La suppression de STING au niveau macrophagique n'entraîne pas cette réponse hépatocytaire. Ces travaux mettent donc en évidence, que l'activation de STING au niveau des macrophages permet d'aggraver la maladie en favorisant l'accumulation de lipides au niveau hépatocytaire et en activant les cellules étoilées pro-fibrosantes (**Figure 29**) (Luo et al., 2018).

Enfin, très récemment, l'étude de Wang et al., montre que la protéine STING est fortement exprimée au niveau des macrophages dérivés de monocytes (CCR2+, S100A9+), des macrophages CD163+ et des Kupffer (CD68+), chez le patient NASH. Leur recrutement est associé à l'expression de STING ; et corrèle avec l'aggravation de la maladie, notamment le grade inflammatoire et le stade de fibrose (Wang et al., 2020).

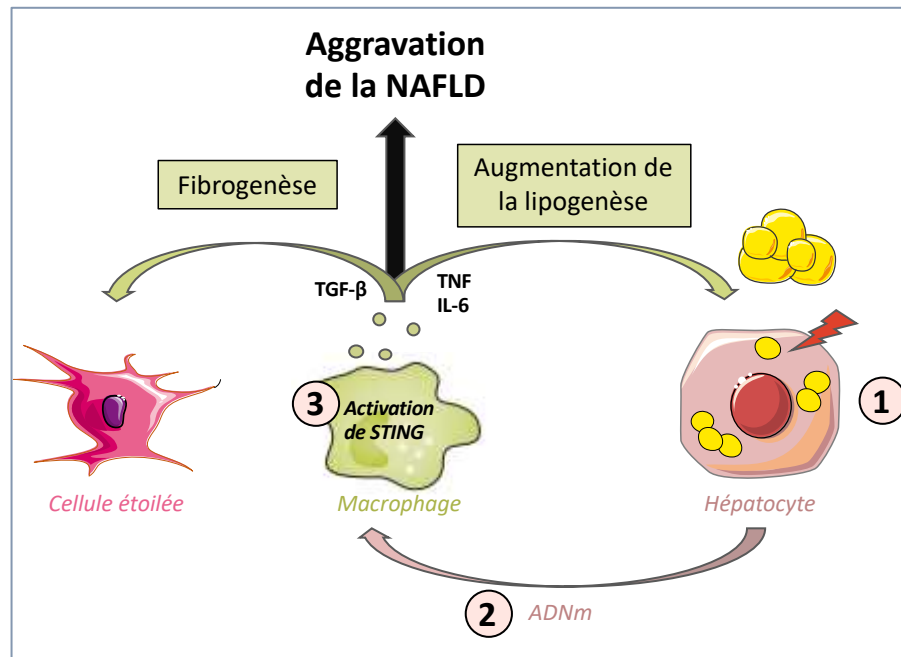


FIGURE 29. STING, UN ACTEUR IMPORTANT DANS L'AGGRAVATION DE LA NAFLD

La libération d'ADN mitochondrial (ADNm) par l'hépatocyte stéatosique endommagé conduit à l'activation de STING au niveau du macrophage hépatique. En réponse, celui-ci met en place une réponse pro-inflammatoire et pro-fibrosante conduisant respectivement à une augmentation de la stéatose et l'activation des cellules étoilées.

2.2.2 Controverse sur la présence de STING dans l'hépatocyte

Comme nous venons de le voir, les deux principales études ayant étudié le rôle de STING dans la NAFLD, montrent que la protéine n'est pas exprimée dans l'hépatocyte. En effet, l'étude de Yu et al le montre à partir d'une purification cellulaire dans un foie sain de souris, et l'étude de Luo et al., le démontre à partir de biopsies de patients stéatosiques (Luo et al., 2018; Yu et al., 2019). Une autre étude vient appuyer ces résultats dans l'hépatocyte sain. Thomsen et al., défendent l'idée que les hépatocytes murins et humains n'expriment pas la protéine STING et ne sont donc pas capables de produire des IFN de type I en réponse à l'infection par le virus de l'hépatite B. Ainsi les hépatocytes sont incapables de monter une défense efficace face à l'infection, et représentent une niche pour la réplication de ce virus. Les auteurs montrent par purification cellulaire que l'hépatocyte sain n'exprime pas la protéine STING, et que l'expression hépato-spécifique de cette protéine permet de répondre efficacement à l'infection par le virus de l'hépatite B (Thomsen et al., 2016).

Cependant, il est largement rapporté que la stimulation de cellules en culture par des acides gras conduit à l'expression et l'activation des acteurs de la voie senseur d'ADN. Par exemple, l'étude de Mao et al., montre que l'apport d'acide palmitique à des cellules endothéliales en culture provoque un stress mitochondrial, accompagné d'une fuite d'ADNm dans le cytoplasme. Cet événement concourt à l'activation de la voie cGAS-STING-IRF3 permettant l'expression de protéines impliquées dans l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales (Mao et al., 2017). De même, il a été rapporté que la stimulation par des acides gras (oléate et palmitate, ratio 2:1) provoque l'activation de la voie cGAS-STING dans une lignée fœtale humaine hépatique (LO2) et conduit à une réponse cellulaire pro-inflammatoire (Qiao et al., 2018). De façon intéressante, une lipotoxicité induite sur la lignée HepG2, par ajout de palmitate, induit la formation d'inclusions protéiques p62+ sous le contrôle de la voie cGAS-STING et notamment l'acteur TBK1 (Cho et al., 2018). Ainsi, l'ensemble de ces résultats permet de suggérer que la stimulation d'hépatocytes en culture par des acides gras pourrait induire l'expression et l'activation de la voie STING, par des reprogrammation génétiques et/ou épigénétiques. De façon intéressante, l'étude de Cho et al, montre que la stimulation d'hépatocytes primaires murins avec du palmitate induit la formation des inclusions protéiques, et que la suppression de STING est suffisante pour empêcher la formation de ces inclusions et l'activation de TBK1. Bien que les auteurs ne vérifient pas l'expression de STING au niveau protéique, il semblerait que STING exerce des fonctions au sein des hépatocytes (Cho et al., 2018). Enfin, très récemment il a été montré que la stimulation d'hépatocytes murins primaires par du palmitate provoque l'expression de STING au niveau protéique ainsi que l'activation de la voie (TBK1-IRF3 et NF- κ B) (Li and Su, 2020). Par ailleurs, une étude sur le rôle de l'immunité innée dans la maladie alcoolique du foie a montré que le facteur IRF3 était l'un des acteurs principaux activant l'apoptose des hépatocytes et favorisant le développement du syndrome. La suppression de STING dans des hépatocytes primaires est suffisante pour prévenir l'activation d'IRF3. Bien que les auteurs ne montrent pas l'expression de la protéine STING, elle semble ici exprimée au niveau du réticulum endoplasmique dans l'hépatocyte (Petrasek et al., 2013). D'après l'ensemble de ces résultats, nous pouvons suggérer que l'hépatocyte n'exprime pas la protéine STING dans un contexte physiologique. Toutefois, lors de dérégulations métaboliques comme la NAFLD ou le syndrome alcoolique, la protéine STING pourrait être exprimée. Des études complémentaires devront donc faire la lumière sur son expression.

Dans cette quatrième et dernière partie, nous nous sommes intéressés à la voie senseur d'ADN : cGAS-STING. De façon simplifiée, elle est constituée de deux acteurs principaux : cGAS et STING. cGAS est le senseur d'ADN capable de reconnaître de l'ADN exogène ou endogène reflétant une infection ou un dérèglement cellulaire comme un stress mitochondrial ou un stress de réplication. Dans ces deux derniers cas, cGAS peut lier directement de l'ADN mitochondrial ou de l'ADN nucléaire (libre ou micronoyaux). En conséquence, cGAS produit un métabolite particulier appelé cGAMP. Il s'agit d'un dinucléotide cyclique capable de fixer STING. Ce dernier va alors déclencher deux signalisations distinctes : Une dépendante d'IRF3 et promoteur de la réponse IFN de type I ; et une autre dépendante de NF- κ B. Par la suite, nous nous sommes intéressés à caractériser l'activation de la voie dans la NAFLD. Grâce à l'utilisation de la souris « STING golden-ticket » (STING^{gt}), il a été montré que la voie de signalisation est principalement activée au niveau des macrophages tissulaires, notamment du tissu adipeux et hépatique. Dans le tissu adipeux, l'activation de la voie participe à l'installation d'une inflammation stérile chronique et au développement de la NAFLD en augmentant la lipolyse. Au niveau hépatique, l'activation de la voie promeut la stéatose, l'inflammation et la fibrose. Il est important de noter que l'expression de la protéine STING au sein de l'hépatocyte est sujet à controverse. Bien que l'hépatocyte soit capable de montrer son expression lorsqu'il est stimulé avec des acides gras, l'expression de la protéine ne semble pas avoir lieu *in vivo*. D'un point de vue global, l'expression hépatocytaire de STING semble être sujette à des régulations, peut-être génétiques et épigénétiques. Afin de pouvoir conclure sur son expression, il est important de faire la lumière sur les acteurs qui pourraient activer la voie dans la NAFLD.

Résultats

I. Préambule

Comme nous l'avons décrit dans la partie introductive, les travaux du laboratoire avaient mis en évidence que la polyploïdisation physiologique hépatique était sous contrôle de la voie de l'insuline. A la vue de « l'épidémie » grandissante de la NAFLD, caractérisée par une perte de sensibilité à l'insuline, l'équipe s'était alors demandée si cette dérégulation pouvait conduire à des modifications de la polyploïdie. Dans ce contexte, Géraldine Gentric, doctorante au laboratoire à cette époque, s'était intéressée à caractériser le profil de ploïdie hépatocytaire du foie de souris et de patients développant une NAFLD. Ses travaux ont mis en lumière qu'un changement de ploïdie survenait lors de la maladie et, était associé à la genèse d'hépatocytes mononucléés polyploïdes ($4n$ et $\geq 8n$), rarement observés dans un foie sain. Grâce à un modèle de culture primaire permettant la synchronisation des hépatocytes dans le cycle cellulaire, l'équipe a montré que les contingents polyploïdes sont générés par des cycles d'endoréplication et ceci suite à l'activation du point de contrôle des dommages de l'ADN (*DNA Damage Response*-DDR : ATR/p53/p21). La NAFLD étant caractérisée par une forte dérégulation des capacités mitochondriales et la production de ROS, capables d'endommager l'ADN, l'équipe avait alors traité les souris et les hépatocytes primaires à l'aide d'un antioxydant (le NAC). Ce traitement permettait de prévenir la formation des contingents polyploïdes *in vivo* et l'activation du DDR en culture primaire. Ainsi, il apparaîtrait que ce changement de profil de ploïdie n'est pas simplement une conséquence de la dérégulation de la voie insulinaire mais la résultante potentielle de la formation de dommages de l'ADN induits par le stress oxydant.

A mon arrivée au laboratoire, et suite aux précédents résultats, l'équipe avait donc dirigé ses travaux selon 3 axes :

- (1) Comprendre l'activation du DDR lors de la réplication des hépatocytes stéatosiques,
- (2) Comprendre le rôle de ces contingents polyploïdes dans la progression de la maladie,
- (3) Analyser le profil de ploïdie des carcinomes hépatocellulaires humains,

Les travaux de Géraldine Gentric ont mis en lumière la possible genèse de dommages de l'ADN lors de la réplication des hépatocytes stéatosiques, induisant l'activation du DDR. Deux études avaient déjà mis en évidence des modifications de l'ADN lors de la NAFLD (8-oxoguanosine et 4-HNE), pouvant servir de marqueurs prédictifs dans l'évolution vers le CHC

(Tanaka et al., 2013; Teufel et al., 2015). D'autres études faisaient l'hypothèse d'un possible rôle des acteurs du DDR dans la pathologie, notamment par la mise en place de cellules sénescentes ou de cellules à fort potentiel d'instabilité génomique (Aravinthan et al., 2013; Tummala et al., 2014). De plus, des équipes de recherche montraient que la prolifération compensatoire des hépatocytes lors de la NAFLD représentait un terrain favorable à l'évolution en CHC, suggérant des défaillances du DDR dans le contrôle de la stabilité génomique des hépatocytes proliférants (Maeda et al., 2005; Park et al., 2010a; Wolf et al., 2014).

Fort de l'ensemble des résultats de la littérature et des expériences réalisées au laboratoire, l'hypothèse de ce premier travail visait à caractériser plus finement les mécanismes conduisant à la genèse de dommages de l'ADN lors de la prolifération compensatoire des hépatocytes et de définir s'ils pouvaient favoriser une instabilité génomique. Ainsi, afin d'étudier cette prolifération compensatoire, qui a lieu à bas bruit *in vivo*, nous nous sommes placés dans un système cellulaire prolifératif : la culture primaire d'hépatocytes. Brièvement, à l'aide d'une perfusion de collagénase, nous sommes capables de récupérer les hépatocytes et de les cultiver pendant 60 heures. Cette première étape de perfusion induit une sortie de quiescence des hépatocytes, qui progressent alors dans la phase G1 du cycle cellulaire avant de bloquer à la transition G1/S. L'ajout d'EGF à 12 heures de culture permet le passage en phase S des hépatocytes de façon synchronisée. Cependant, il est important de noter que ces hépatocytes primaires perdent certaines capacités métaboliques après 60 heures de culture, ce qui rend impossible l'étude de mécanismes moléculaires et cellulaires au-delà. Des premières expériences, réalisées sur les modèles murins ob/ob et MCD (utilisés auparavant par le laboratoire comme modèles de stéatose) montraient bien la genèse de dommages de l'ADN avec présence du marqueur γ H2AX lors de la réplication de ces hépatocytes stéatosiques. Cependant, à cette époque, la communauté scientifique s'efforçait de trouver des modèles murins plus adaptés à l'étude de la NAFLD. Ainsi, nous avons décidé de concentrer nos travaux sur deux modèles plus pertinents: **(1)** Le modèle de stéatose hépatique : **High-Fat High-Sucrose (HFHS)** contenant 45% de graisses saturées et 30% de sucrose, qui permet de récapituler les apports nutritifs lors d'une malnutrition; **(2)** Le modèle de stéatose sévère : **Choline-Deficient High-Fat diet (CDHFD)** contenant 40% de graisses saturées, dans lequel la choline n'est pas ajoutée, afin d'empêcher l'export des VLDL. Bien que ce modèle ne représente pas tout à fait le comportement humain (perte de la choline), il permet de récapituler d'un point de vue histologique les différentes altérations tissulaires et l'évolution vers le CHC. L'ensemble des

résultats obtenus pour ce premier projet est présenté dans la partie « I » de ce chapitre, et est actuellement en cours de soumission pour la revue « GUT » où je suis premier auteur.

Par ailleurs, afin de comprendre le rôle de ces contingents polyploïdes mononucléés générés dans la NAFLD, j'ai mis en place dès le début du Master 2, des modèles murins particuliers. L'hypothèse de départ était de supprimer certains acteurs du DDR (ATR et/ou ATM) afin d'empêcher la mise en place des cycles d'endoréplication. En effet, un article publié dans la revue Nature permettait de comprendre comment générer des modèles de mutations géniques à l'aide de l'outil CRISPR/Cas9, véhiculé par un **Adéno-Associated Virus 8** (AAV8) pour un ciblage hépato-spécifique (Ran et al., 2015). J'ai ainsi généré plusieurs modèles murins de mutations des gènes du DDR sous différents régimes NAFLD. Une partie des données nous a permis de comprendre le rôle d'ATR lors de la réplication des hépatocytes stéatosiques. Celles-ci seront discutées par la suite, dans la partie « Discussion ». Afin de générer des données complètes, nous avons placées nos souris sous régimes CDHFD et HFHS sur des temps très longs (1an et demi). Actuellement, ce projet est conduit à deux autres doctorants du laboratoire, Mäeva Saroul-Aïnama et Pierre Cordier, afin de disséquer les mécanismes moléculaires et cellulaires de la défaillance des points de contrôle des dommages de l'ADN lors de la NAFLD.

Enfin, lors de mon arrivée au laboratoire, une post-doctorante, Myriam Bou-Nader, s'intéressait à caractériser les profils de ploïdie dans les carcinomes hépatocellulaires humains. Le but de ce projet était de savoir si des hépatocytes polyploïdes pouvaient participer à des processus de tumorigenèse. Nous avons ensemble, mis au point une Macro, capable de quantifier et de cartographier les hépatocytes (transformés ou non) dans le parenchyme hépatique cirrhotique et tumoral. Ces résultats seront présentés dans la partie « II » de ce chapitre. J'ai notamment contribué aux expériences lors de la révision du papier pour le journal GUT, où je suis deuxième auteur.

II. Replication Stress triggered by nucleotide pool imbalance drives DNA Damage and cytosolic DNA sensing pathway activation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

Romain Donne¹, Maëva Saroul-Aïnama^{1*}, Pierre Cordier^{1*}, Adel Hammoutene^{2§}, Mira Stadler^{3§}, Christelle Kabore¹, Isabelle Galy-Fauroux¹, Mounia Herrag⁴, Marie Da Cruz⁴, Ivan Nemazany⁵, Stefano Caruso⁶, Stephanie Bonnafous⁷, Albert Tran⁷, Philippe Gual⁷, Valérie Paradis^{2,8}, Mathias Heikenwälder³, Patrick Revy⁴ and Chantal Desdouets¹

1) Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, Université de Paris, F-75006, Paris, France

2) Université de Paris, Centre de recherche sur l'inflammation, Inserm, U1149, CNRS, ERL8252, F-75018 Paris, France

3) Division of Chronic Inflammation and Cancer (F180), German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany

4) Laboratory of Genome Dynamics in the Immune System, Labellisé Ligue, INSERM UMR 1163, Université de Paris, Institut Imagine, Paris, France

5) Platform for Metabolic Analyses, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24/CNRS UMS 3633, Paris, France

6) Functional Genomics of Solid Tumors Team, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, Université de Paris, Université Paris 13, Labex Immuno-Oncology, Équipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Paris, France.

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

8) Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Beaujon, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Clichy, France

* / § These authors contributed equally

SUMMARY

Objectives: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common cause of chronic liver disease worldwide. NAFLD has a major effect on the intrinsic proliferative investigated the molecular mechanisms underlying activation of the DNA damage response during NAFLD.

Design: C57BL/6 males were fed for 6 months with High-fat/high-Sucrose (HFHS), Choline-Deficient High Fat (CDHFD) diet or standard diet. Replication dynamic has been evaluated by DNA combing method. Gene expression profiling analyses combined with molecular and cellular approaches were used to characterize DNA lesions and the activation of cGAS-STING pathway. Metabolic disturbances were determined using LC-MS. Data was also collected on cohorts of NAFLD patients.

Results: Proliferating NAFLD hepatocytes harbor a global perturbation of the DNA replication program altering the speed of replication forks and activating ATR/CHK1 pathway. This replication stress was sufficient to cause DNA breaks in murine NAFLD hepatocytes. Nucleotide pool imbalance occurring during NAFLD was the key driver of replication stress. Remarkably, DNA lesions drive the activation of the cGAS/STING system a major component of cells' intrinsic immune response. The translational significance of these studies was further reiterated by showing that lipid overload in proliferating human hepatocytes was sufficient to induce replication stress. Moreover, livers of human patients with NAFLD displayed nucleotide pathway dysbalance and the cGAS-STING genes deregulation.

Conclusion: Altogether, our findings shed new light on the mechanisms by which damaged NAFLD hepatocytes might promote NAFLD progression.

Keywords: Liver, Non-Alcoholic steatohepatitis, Cell proliferation, DNA damage, liver metabolism

KEYWORDS: Liver, Non-Alcoholic steatohepatitis, Cell proliferation, DNA damage, liver metabolism

INTRODUCTION

Obesity and diabetes are now considered to be pandemic social and economic burdens. The liver is one of the key organs affected by these conditions, resulting in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [1–5], newly defined as Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) [6]. NAFLD is characterized by excessive triglyceride accumulation in hepatocytes in the absence of significant alcohol consumption. The prevalence of NAFLD is currently estimated at 25% in the general population [7,8]. NAFLD encompasses a spectrum of liver conditions ranging from simple hepatic steatosis or non-alcoholic fatty liver (NAFL) to the concomitant presence of hepatocellular damage (ballooning), Mallory-Denk body formation, and lobular necro-inflammation, defining non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which can lead to various degrees of additional fibrosis [9–12]. The risk of adverse outcomes is low for NAFL, whereas NASH can progress to more severe stages, such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) [2,13]. NAFLD is currently driving an alarming increase in the incidence and prevalence of HCC in developed and developing countries, and it has been predicted that NAFLD will become the most common underlying etiological risk factor for HCC and liver transplantation in the future [14–16].

NAFLD is a complex disease, the development and progression of which require multiple parallel hits (dietary habits, environmental factors) in genetically predisposed individuals [4,17–21]. One of the main mechanisms observed in NAFLD pathogenesis is hepatocyte lipotoxicity. While triglyceride accumulation is believed to be relatively benign (e.g. steatosis), hepatocyte lipotoxicity is thought to be chiefly caused by free fatty acids and their metabolites [4,22,23]. These changes within the liver place extra metabolic stress on various organelles, such as the mitochondria and endoplasmic reticulum, triggering a cascade of stress-induced responses, including the generation of reactive oxygen species (ROS) [24–26]. This leads to further cell injury, culminating in inflammation, programmed cell death (apoptosis), and fibrotic remodeling [2,27,28]. The progression or resolution of NASH depends on the balance between cell injury and regeneration [29]. Interestingly, high levels of lipogenesis, liver damage, and immune infiltration have been identified as key drivers of the development of murine steatohepatitic HCC [28,30,31].

NAFLD has a major effect on the intrinsic proliferative properties of hepatocytes [32–35]. The hepatocytes of patients with NAFLD express senescence markers such as p21, short telomeres, large numbers of senescence-associated DNA damage foci, and larger nuclei [36–

40]. Interestingly, studies in animals have shown that a reduction in the number of senescent cells reduces overall hepatic steatosis[40]. Oxidative DNA damage also affects the division of NAFLD hepatocytes. Such damage is more pronounced in the livers of NASH patients developing HCC than in those without HCC [41,42]. In mouse models of NASH, oxidative stress activates the DNA damage response (DDR) in dividing fatty hepatocytes [38,43]. Compensatory proliferation and the DNA damage response are in fact the key determinants of cancer development in patients with chronic liver disease, notably in a NAFLD context [44]. Although several studies provided evidence that aberrant metabolism, inflammatory microenvironment, and compensatory hepatocyte proliferation¹, [28,30,31], [44] are key features in NASH-HCC pathogenesis, it is still important to determine the major molecular events underlying activation of the DNA damage response during NAFLD.

Here, we show that proliferating NAFLD hepatocytes harbor a global perturbation of the DNA replication program altering the speed of replication forks and activating ATR/CHK1 pathway. Consequently, replication-associated DNA lesions accumulate in NAFLD hepatocytes. Our finding also demonstrate that nucleotide pool imbalance is a key feature of NAFLD and contributes to replication stress in fatty hepatocytes. Finally, we show that DNA lesions in NAFLD hepatocytes drive activation of the cGAS/STING system a major component of cells' intrinsic immune response.

RESULTS

Proliferating NAFLD hepatocytes experience replication stress.

To address whether DDR activation is due to the disturbance of replication dynamics in NAFLD hepatocytes, we used two well-described mouse models of NAFLD: C57BL/6J mice fed a high-fat high-sucrose diet (HFHS) [45] or a choline-deficient high-fat diet (CDHFD) [28]. As expected, the mice fed a HFHS or a CDHFD diet for six months were heavier than mice fed a standard diet (SD) (Fig. S1 A). Analyses of liver sections revealed that a HFHS diet or CDHFD consistently led to mixed macro-mediovesicular, predominantly centrilobular steatosis (Fig. S1 B). NAFLD activity score (NAS) was significantly higher in the livers of mice fed the CDHFD than in those of mice fed the HFHS diet, due to the presence of marked steatosis and lobular inflammation (Fig. S1, B and C). We analyzed parameters of replication in primary hepatocytes isolated from control and NAFLD livers (HFHS, CDHFD), which are known to be a relevant *ex vivo* model for studying cell division (Fig. 1 A)[38,46–48]. As previously described, freshly isolated hepatocytes seeded in growth media initiated G1 phase, and progressed into S-phase after 36 hours [38,49,50]. The percentage of BrdU-positive cells in the HFHS/CDHFD population was similar to that in control cells between 36 and 48 hours but was significantly higher at 60 hours suggesting that NAFLD hepatocytes may have difficulty replicating their genome (Fig. S2, A and B). Replication dynamic was first analyzed by defining DNA replication fork progression on single DNA molecules stretched by DNA combing [51]. For this purpose, proliferating hepatocytes from SD, HFHS and CDHFD mice were subjected to double-labeling with successive pulses of the thymidine analogs 5-chloro-2'-deoxyuridine (CldU) and 5-iodo-2'-deoxyuridine (IdU) (Fig. 1 B). DNA fiber imaging revealed that HFHS and CDHFD hepatocytes had shorter nascent DNA tracks than SD hepatocytes (Fig. 1 B). Quantification confirmed that replication fork speed was significantly lower in NAFLD hepatocytes (Fig. 1 C), demonstrating the

occurrence of replication stress (RS) in these cells [52–55]. ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related) plays a key role in the response to replication stress and acts as an S-phase checkpoint protein kinase [56]. The principal signal triggering ATR activation is replication protein A (RPA)-coated ssDNA [57]. Once activated, ATR coordinates cell cycle progression, replication fork protection, repair and restart mechanisms through the phosphorylation of specific targets, such as the CHK1 effector kinase and RPA itself (pCHK1^{s317} and pRPA32^{s33}, respectively). Consistent with an activation of the replication stress response, we observed a sharp increase in the phosphorylation of CHK1 and RPA32 in HFHS and CDHFD primary hepatocytes, whereas this signal was barely detectable in SD cells (Fig. 1, D and E). We further explored the underlying mechanisms, by performing pathway profiling for genes differentially expressed between NAFLD and control dividing hepatocytes. Gene set enrichment analysis (GSEA) identified multiple pathways involved in cell cycle checkpoints, such as the G2/M checkpoint, p53 signaling and DNA repair, among the top-ranking genes differentially expressed between proliferating NAFLD hepatocytes and control cells (Fig. 1 F). Importantly, we confirmed the association between a replication stress gene signature and the genes upregulated in proliferating HFHS/CDHFD hepatocytes, including genes encoding DNA lesion recognition and DNA repair proteins (Fig. 1 G). Quantitative PCR analyses also demonstrated an increase, in NAFLD hepatocytes, in the expression of key factors involved in nucleotide excision repair (NER) (*Xpf*, *Xpc*, *Ercc1*), the repair of oxidized bases (*Neil*, *Ogg1*), homologous recombination (*Brca1*, *Rad51*) and DNA lesion signaling (*Gadd45a*, *FancI*) (Fig. 1 H). Overall, our findings show that NAFLD hepatocytes suffered from replication stress, leading to an activation of the ATR/CHK1 pathway.

Replication stress drives DNA damage in NAFLD hepatocytes

We next investigated whether *in vivo* compensatory regeneration occurring during NAFLD was a source of DNA damage in proliferating hepatocytes. Co-staining for γ H2AX and PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) was performed on liver sections from SD, HFHS and CDHFD mice (Fig. 2 A). It is noteworthy that most proliferating NAFLD hepatocytes are also stained for γ H2AX compared to SD hepatocytes (Fig. 2B). As replication stress is a major source of chromosomal lesions⁵⁹, we explored whether NAFLD dividing hepatocytes that have experienced replication stress accumulate DNA damage. Western blot analysis from primary cultures revealed that γ H2AX was barely detectable in control hepatocytes (Fig. 2, C and D). By contrast, high levels of γ H2AX were detected in HFHS/CDHFD hepatocytes, particularly at 60 hours, when the NAFLD hepatocytes were experiencing replication stress (Fig. 2, C and D, Fig. 1, C and D). For validation of this finding, co-immunostaining was performed with antibodies against γ H2AX and a phosphorylated form of histone H3 (pHH3, a marker of nuclei in G2) (Fig. 2 E). Strikingly, the pHH3-labeled NAFLD nuclei had higher γ H2AX levels than the pHH3-negative nuclei (Fig. 2, E and F). These data indicate that NAFLD hepatocytes accumulate replication-associated DNA damage. To further explore the type of DNA damage, alkaline comet assay was performed. These assays detect DNA double (DSB) and/or single-strand (SSB) breaks, by measuring nuclear DNA tails. We observed no nuclear tails in SD nuclei (Fig. 2 G). By contrast, HFHS and CDHFD nuclei presented extensive DNA strand breaks; these lesions being more pronounced in CDHFD hepatocytes (Fig. 2 G). Finally, we quantified 53BP1 foci, an established mediator of DSB repair (Fig. 2 H). At least 4 foci per nucleus are considered as a mark of spontaneous DSB lesions⁶³. We observed a small number of 53BP1 nuclear bodies in SD and HFHS hepatocytes (Fig. 2, H and I). We confirmed that DNA lesions were more pronounced in CDHFD hepatocytes as they presented nuclei with a higher number of 53BP1 nuclear bodies

(Fig. 2, H and I). Collectively, these results show that replication stress is sufficient to elicit hepatocyte DNA lesions in the context of NAFLD.

Finally, we investigated whether lipid overload was sufficient to induce replication stress and signs of DNA damage in human hepatocytes. We used the metabolically competent human hepatocyte-like cell line HepaRG for this purpose. These cells have been shown to be a valuable model for investigating the key metabolic mechanisms involved in disease pathogenesis [58,59]. We treated confluent differentiated human HepaRG (dHepaRG) cells for 96 hours with a mixture of palmitic acid and oleic acid (FA-treated), to mimic lipid overload [28,60]. Parameters of replication and DNA damage were quantified after reseeding cells to create a proliferative context (Fig. S3 A). As expected, lipid accumulation was visible in FA-treated cells on neutral oil red O staining (Fig. S3 B). The FA-treated cells displayed a slower progression of replication forks (Fig. S3 C). Accumulation of DNA damage evaluated by comet assays and γ H2AX expression was more elevated in FA-treated than untreated cells (Fig. S3, D-E-F). These results demonstrate that lipid overload in proliferating human hepatocytes leads to replication stress and consequently to DNA damage.

Alteration of the nucleotide pool results in DNA replication stress during NAFLD

Obstacles to replication fork progression can arise from several endogenous or exogenous sources, ranging from a depletion of the nucleotide pools available for DNA synthesis to transcription-replication machinery collisions, the formation of RNA-DNA hybrids, and oncogene-induced increases in replication origin firing [55]. Extensive metabolic reprogramming occurs during the pathogenesis of NAFLD. We investigated whether metabolic disturbances interfered with the replicative machinery in this context. We first performed targeted metabolomic analyses by tandem liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

on HFHS, CDHFD and SD livers. As expected, the development of NAFLD led to metabolic reprogramming in HFHS/CDHFD livers (Fig. 3, A and B). Interestingly, we observed a significant change in purine and pyrimidine metabolism in HFHS and CDHFD livers relative to SD livers, reflecting nucleotide deregulation (Fig. 3, A and B). In the same way, our transcriptomic analysis of replicating NAFLD hepatocytes revealed an enrichment in genes linked to nucleotide biosynthesis among the downregulated genes in these cells (Fig. 3 C). Accordingly, LC-MS showed that replicating NAFLD hepatocytes had an imbalanced nucleotide pool (Fig. 3 D) (Fig. S4, A and B). Monophosphate and diphosphate nucleotides accumulated in NAFLD hepatocytes (Fig. S4, C and D). By contrast, the cellular concentrations of deoxyadenosine triphosphate (dATP) and deoxythymidine triphosphate (dTTP) were low in these cells (Fig. 3 E). The nucleotide pool is known to be a limiting factor for the correct progression of replication [61]. We investigated the connection between the imbalance in the nucleotide pool and replication stress, by providing proliferating NAFLD hepatocytes with additional dNTPs during replication stress. Remarkably, the addition of dNTPs to NAFLD hepatocytes rescued the replication stress, as demonstrated by the lower levels of a reduction of CHK1 activation and γ H2AX accumulation (Fig. 3, F and G). Consistently, fewer DNA breaks accumulated in NAFLD hepatocytes treated with dNTPs than in untreated cells (Fig. 3 H). Finally, we investigated whether a nucleotide pool imbalance occurs during human NAFLD. Patients were selected and divided in three groups: normal control (n=5), steatosis (n=4) and NASH (n=4). The clinical and histological details of the patients are summarized in Table 1. Quantification of metabolites was performed on resected liver tissues by LC-MS approach (Fig. S5, A and B). We observed significant changes in purine and pyrimidine metabolism in both steatotic and NASH livers relative to controls (Fig. 4, A and B). Overall, our data demonstrate that nucleotide pool imbalance is a key feature of NAFLD and contributes to replication stress in fatty hepatocytes.

Table 1. Clinical characteristics of patients included in the metabolomic analysis.

	Healthy	Steatotic	NASH
n	5	4	4
Age (years)	42,6 ± 15,6	67,3 ± 8,8	73 ± 4
Sex (F/M)	5/0	2/2	1/3
Grade of steatosis	0	S1 (3/4) S2 (1/4)	S1 (2/4) S2 (2/4)
Grade of activity	0	0	A3 (4/4)
Stage of Fibrosis	0	0	F3 (2/4) F4 (2/4)
NAS score	0	1 (2/4) 2 (2/4)	3 (1/4) 4 (3/4)

Replicating NAFLD hepatocytes display cGAS-STING pathway activation

We finally investigated whether DNA lesions induced by replication stress in NAFLD hepatocyte could be sensed by components of the innate immune system. A recent study has demonstrated a connection between replication stress and the cytosolic DNA-sensing pathway- the cyclic GMP-AMP synthase - stimulator of interferon genes or cGAS-STING pathway in cancer cell lines [62]. This pathway is involved in various biological processes, including type I interferon (IFN-I) production, senescence and inflammation [63]. First, we investigated whether *in vivo*, enhance STING expression in hepatocytes was correlated with NAFLD development. Using RNAscope, we found that 40% of normal hepatocytes express STING mostly at a low level (Fig. 5, A-B). In HFHS and CDHFD livers, we observed a higher abundance of STING expression in 70% of the hepatocyte contingent (Fig. 5, A-B). We next investigated whether STING was more expressed in replicating NAFLD hepatocytes. Importantly, we observed that STING expression (mRNA and protein levels) was strongly upregulated in NAFLD hepatocytes that had experienced replication stress (Fig. 5, C-D-E). The levels of *IFN-β* and IFN-stimulated gene (ISGs: *Mx1* and *Isg15*) transcripts were also higher in these cells (Fig. 5 F). Most importantly, quantification of IFN-β synthesis revealed that this cytokine was overproduced in

NAFLD hepatocytes that had experienced replication stress (60 h vs. 36 h) (Fig. 5 G). Together, these data strongly suggest that the replication stress observed in NAFLD hepatocytes drives activation of the cGAS-STING pathway. We tested this hypothesis by determining whether dNTP supplementation during replication stress could modulate activation of the DNA-sensing pathway. We found that the addition of dNTPs decreased STING accumulation (Fig. 5, H and I). Finally, we investigated the relationship between hepatic *cGAS* and *STING* expression and human NAFLD progression. Human liver biopsy specimens from morbidly obese patients ($n=27$) were selected and classified into two groups: with and without NAFLD (Table 2). We observed that the levels of *cGAS* and *STING* mRNA in the liver were upregulated specifically in obese patients with NAFLD (Fig. 5 J), and that the levels of *cGAS* and *STING* expression were positively correlated (Fig. 5 K). *STING* expression was positively correlated with NAFLD activity score (NAS) (Fig. 5 L). Together, these data show that replication stress in NAFLD hepatocytes drives activation of the DNA-sensing pathway. They also suggest a role for DNA-sensing pathways in human NAFLD progression.

Table 2. Clinical characteristics of patients included to analyze *cGAS/STING* mRNA expression

	Without NAFLD		With NAFLD		p-value
n	5		22		
Age (years)	40.40	± 5.56	39.05	± 2.14	0.750
Sex (F/M)	4/1		13/9		0.382
BMI (kg/m ²)	43.00	± 0.55	42.22	± 1.13	0.935
ALT (IU/L)	13.80	± 1.80	65.95	± 13.29	<0.001
Insulin level (mIU/L)	11.8	± 3.67	29.64	± 5.33	0.058
Glucose level (mmol/L)	4.85	± 0.15	6.68	± 0.76	0.024
HOMA-IR	2.46	± 0.68	8.78	± 1.95	0.046
HbA1c (%)	5.28	± 0.24	6.37	± 0.31	0.020
Triglycerides (mmol/L)	0.82	± 0.08	2.74	± 0.50	0.001
HDL cholesterol (mmol/L)	1.80	± 0.17	1.27	± 0.07	0.006
NAFLD Activity Score (n)	0(5)		3(10)/5(12)		
Grade of steatosis (n)	0(5)		3(22)		
Lobular inflammation (n)	0(5)		0(10)1(12)		
Hepatocellular ballooning (n)	0(5)		0(10)1(12)		

DISCUSSION

Non-alcoholic fatty liver disease is complex, and its pathogenesis has yet to be clearly elucidated. Steatohepatitis (NASH) causes more liver damage than simple steatosis (NAFL). Considerable efforts are therefore being made to find ways of stopping the chain of events driving the NAFL/NASH sequence. Here, we demonstrate, for the first time, that NAFLD hepatocytes display hallmarks of replication stress, including slow replication fork progression and the activation of an S-phase checkpoint (ATR signalling). Replication-associated DNA lesions accumulate in NAFLD hepatocytes, and the nucleotide pool imbalance occurring during NAFLD is the key driver of replication stress (Fig. 6). Finally, we show that NAFLD hepatocytes that have experienced replication stress display an activation of the cGAS-STING pathway, inducing a type I interferon response (Fig. 6). Overall, our data shed new light on the mechanisms by which damaged fatty hepatocytes might promote NASH progression.

Recent studies have provided evidence for a role of the gradual accumulation of DNA lesions in NAFLD progression. For instance, oxidative DNA damage has been shown to be associated with NAFLD development in humans [41,42]. In addition, a decrease in nucleotide excision repair (NER) is observed during the steatosis/NASH sequence related to hepatic inflammation [64]. In various chronic liver diseases, DNA damage and genetic instability are hallmarks of disease aggravation enhanced by compensatory regeneration [2], [44]. In order to dissect molecular events during NAFLD, we used one mouse model of simple steatosis (HFHS) and one mouse model of advanced steatosis (CDHFD). Our findings reveal a novel molecular mechanism underlying DDR activation during NAFLD. We show a decrease in replication fork speed in proliferating NAFLD hepatocytes, reflecting the replication stress suffered by these cells. This replication stress was sufficient to elicit DNA lesions. Interestingly, our findings illustrated that there is an underperforming ATR-mediated signaling in CDHFD compared with HFHS

hepatocytes (CHK1 and RPA activation), in correlation with fork speed progression. We also observed that HFHS hepatocytes present simple DNA lesions (comet tail without 53BP1 foci) while CDHFD hepatocytes present in addition double-strand breaks DNA lesions (comet tail with 53BP1 foci). Of note, one function of ATR is to cope with stalled DNA replication forks in order to avoid fork collapsing and DSB occurrence [65]. Interestingly, a previous study has observed in fibroblast of patient carries heterozygous mutations in the *ATR* gene, that these cells with a reduced ATR-dependent DNA damage signaling present DSB [51]. We can suggest that during NAFL/NASH sequence, replication stress conjointly to an underperforming DDR could drive accumulation of more severe DNA lesions in fatty hepatocytes and may favor transformation.

Replication stress is a major driver in the development and progression of many cancers and more recently have been shown to be involved in diseases related to autoimmunity and chronic inflammation [57,66–68]. Our data show that in NAFLD, an emblematic metabolic reprogramming disease, fat overload in hepatocytes drives replication stress. The sources of replication stress can be diverse [54,69]. The size and balance of the dNTP pools are major determinants of fork speed and genome stability [55]. Various studies have shown that nucleotide pool disequilibrium in precancerous and cancerous human cells impedes fork progression, leading to genome instability [70,71]. We show here that a nucleotide pool imbalance promotes replication stress in the context of NAFLD. Indeed, one of the key findings of our study was that nucleoside supplementation was sufficient to prevent the activation of the S-phase checkpoint and the accumulation of DNA breaks. This finding suggested that DNA replication proceeds under suboptimal conditions during NAFLD progression, with nucleotide deficiency resulting in DNA lesions. In our study it appears that nucleotides are not converted in dNTPs, suggesting a lack of other essential metabolites in the nucleotide pathway or enzyme

deficiency. Further studies are required to identify the factors affecting the nucleotide pool imbalance during the metabolic reprogramming occurring in chronic liver disease.

Another important finding of this study is the link we have established between DNA lesions induced by replication stress in NAFLD hepatocytes and activation of the cGAS-STING pathway. This cytosolic DNA sensor was initially identified as playing a key role in the generation of an immune response to DNA viruses and bacteria [63,72,73]. Several studies have since demonstrated that the cGAS-STING pathway is activated by DNA damage in antitumor immunity, senescence, apoptosis and inflammatory responses [63,67]. cGAS senses cytoplasmic DNA resulting from nuclear DNA damage. This nuclear DNA damage may generate either micronuclei due to chromosome missegregation or a cytosolic accumulation of replication fork-derived single-stranded DNA (ssDNA) related to replication stress [62,63,67,72,73]. By contrast to what has been previously reported, we observed that normal hepatocytes do express STING at a weak level. In the context of NAFLD, we demonstrated that macrophages are not the only cell contingent capable of activating the cGAS-STING pathway [74,75]. Indeed, STING expression was enhanced in nonalcoholic fatty hepatocytes. More importantly, our findings demonstrate that the cGAS-STING pathway connects hepatocyte replication stress to interferon production in NAFLD. Recent studies have provided evidence to suggest that exonucleases are essential for ssDNA degradation in cancer cells, and for restraining the cGAS-STING response [62,76]. It could be speculated that exonuclease activity during NAFLD development is insufficient to counteract the accumulation of RS-induced DNA lesions. Given the role of the cytosolic DNA-sensing cGAS-STING pathway in activating immune surveillance, it has generally been assumed that this pathway has a primary tumor suppressor function [63,67,77]. However, there is growing evidence to suggest that, depending on the context, this pathway can also drive inflammation-mediated tumorigenesis [63,78,79]. Future

studies are required to determine whether replication stress and the cGAS-STING pathway may prevent or drive NAFLD-associated HCC development.

REFERENCES

- 1 Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:330–44. doi:10.1038/nrgastro.2013.41
- 2 Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, et al. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16:411–28. doi:10.1038/s41575-019-0145-7
- 3 Diehl FF, Lewis CA, Fiske BP, et al. Cellular redox state constrains serine synthesis and nucleotide production to impact cell proliferation. *Nat Metab* 2019;1:861–7. doi:10.1038/s42255-019-0108-x
- 4 Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 2018;24:908–22. doi:10.1038/s41591-018-0104-9
- 5 Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15:11–20. doi:10.1038/nrgastro.2017.109
- 6 Eslam M, Sanyal AJ, George J, et al. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2020;158:1999-2014.e1. doi:10.1053/j.gastro.2019.11.312
- 7 Estes C, Razavi H, Loomba R, et al. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatol Baltim Md* 2018;67:123–33. doi:10.1002/hep.29466
- 8 Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73–84. doi:10.1002/hep.28431
- 9 Brunt EM, Kleiner DE. Challenges in the hepatic histopathology in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2017;66:1539–40. doi:10.1136/gutjnl-2016-313379
- 10 Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467–74. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x
- 11 Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Baltim Md* 2005;41:1313–21. doi:10.1002/hep.20701
- 12 Singh S, Allen AM, Wang Z, et al. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13:643-54 e1-9; quiz e39-40. doi:10.1016/j.cgh.2014.04.014
- 13 Fingas CD, Best J, Sowa JP, et al. Epidemiology of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Hoboken* 2016;8:119–22. doi:10.1002/cld.585

- 14 Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol* 2012;56:1384–91.
- 15 Wang X, Li J, Riaz DR, et al. Outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:394-402 e1. doi:10.1016/j.cgh.2013.09.023
- 16 Wong RJ, Cheung R, Ahmed A. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. *Hepatology* 2014;59:2188–95. doi:10.1002/hep.26986
- 17 Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* Published Online First: 4 January 2016. doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012
- 18 Diehl AM, Day C. Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med* 2017;377:2063–72. doi:10.1056/NEJMra1503519
- 19 Taliento E, Dallio M, Frederico A, et al. Novel Insights Into the Genetic Landscape of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Env Res Public Health* 2019;1:1–13.
- 20 Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010;52:1836–46. doi:10.1002/hep.24001
- 21 Valenti LVC, Baselli GA. Genetics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A 2018 Update. *Curr Pharm Des* 2018;24:4566–73. doi:10.2174/1381612825666190119113836
- 22 Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343–51. doi:10.1172/JCI23621
- 23 Mota M, Banini BA, Cazanave SC, et al. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2016;65:1049–61. doi:10.1016/j.metabol.2016.02.014
- 24 Begriche K, Massart J, Robin M-A, et al. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Baltim Md* 2013;58:1497–507. doi:10.1002/hep.26226
- 25 Kim JY, Garcia-Carbonell R, Yamachika S, et al. ER Stress Drives Lipogenesis and Steatohepatitis via Caspase-2 Activation of S1P. *Cell* 2018;175:133-145.e15. doi:10.1016/j.cell.2018.08.020
- 26 Lebeaupin C, Vallée D, Hazari Y, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2018;69:927–47. doi:10.1016/j.jhep.2018.06.008
- 27 Schwabe RF, Luedde T. Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15:738–52. doi:10.1038/s41575-018-0065-y

- 28 Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K, et al. Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer Cell* 2014;26:549–64. doi:10.1016/j.ccell.2014.09.003
- 29 Wegermann K, Diehl AM, Moylan CA. Disease pathways and molecular mechanisms of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Hoboken* 2018;11:87–91. doi:10.1002/cld.709
- 30 Nakagawa H, Umemura A, Taniguchi K, et al. ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. *Cancer Cell* 2014;26:331–43. doi:10.1016/j.ccr.2014.07.001
- 31 Gomes AL, Teijeiro A, Burén S, et al. Metabolic Inflammation-Associated IL-17A Causes Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* 2016;30:161–75. doi:10.1016/j.ccell.2016.05.020
- 32 Collin de l’Hortet A, Zerrad-Saadi A, Prip-Buus C, et al. GH administration rescues fatty liver regeneration impairment by restoring GH/EGFR pathway deficiency. *Endocrinology* 2014;155:2545–54. doi:10.1210/en.2014-1010
- 33 Leclercq IA, Vansteenbergh M, Lebrun VB, et al. Defective hepatic regeneration after partial hepatectomy in leptin-deficient mice is not rescued by exogenous leptin. *Lab Invest* 2006;86:1161–71.
- 34 Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, et al. Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* 2007;133:80–90. doi:10.1053/j.gastro.2007.05.012
- 35 Yang S, Koteish A, Lin H, et al. Oval cells compensate for damage and replicative senescence of mature hepatocytes in mice with fatty liver disease. *Hepatology* 2004;39:403–11.
- 36 Aravinthan A, Scarpini C, Tachtatzis P, et al. Hepatocyte senescence predicts progression in non-alcohol-related fatty liver disease. *J Hepatol* 2013;58:549–56. doi:10.1016/j.jhep.2012.10.031
- 37 Donati B, Pietrelli A, Pingitore P, et al. Telomerase reverse transcriptase germline mutations and hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Cancer Med* 2017;6:1930–40. doi:10.1002/cam4.1078
- 38 Gentric G, Maillet V, Paradis V, et al. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2015;125:981–92. doi:10.1172/JCI73957
- 39 Nakajima T, Nakashima T, Okada Y, et al. Nuclear size measurement is a simple method for the assessment of hepatocellular aging in non-alcoholic fatty liver disease: Comparison with telomere-specific quantitative FISH and p21 immunohistochemistry. *Pathol Int* 2010;60:175–83. doi:10.1111/j.1440-1827.2009.02504.x
- 40 Ogrodnik M, Miwa S, Tchkonja T, et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun* 2017;8:15691. doi:10.1038/ncomms15691

- 41 Nishida N, Yada N, Hagiwara S, et al. Unique features associated with hepatic oxidative DNA damage and DNA methylation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2016;31:1646–53. doi:10.1111/jgh.13318
- 42 Tanaka S, Miyanishi K, Kobune M, et al. Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2013;48:1249–58. doi:10.1007/s00535-012-0739-0
- 43 Gentric G, Celton-Morizur S, Desdouets C. Polyploidy and liver proliferation. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015;36:29–34.
- 44 Boege Y, Malehmir M, Healy ME, et al. A Dual Role of Caspase-8 in Triggering and Sensing Proliferation-Associated DNA Damage, a Key Determinant of Liver Cancer Development. *Cancer Cell* 2017;32:342-359.e10. doi:10.1016/j.ccell.2017.08.010
- 45 Verbeek J, Lannoo M, Pirinen E, et al. Roux-en-y gastric bypass attenuates hepatic mitochondrial dysfunction in mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2015;64:673–83. doi:10.1136/gutjnl-2014-306748
- 46 Hsu SH, Delgado ER, Otero PA, et al. MicroRNA-122 Regulates Polyploidization in the Murine Liver. *Hepatology* Published Online First: 26 March 2016. doi:10.1002/hep.28573
- 47 Margall-Ducos G, Celton-Morizur S, Couton D, et al. Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. *J Cell Sci* 2007;120:3633–9. doi:10.1242/jcs.016907
- 48 Wirth KG, Wutz G, Kudo NR, et al. Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression. *J Cell Biol* 2006;172:847–60.
- 49 Duncan AW, Taylor MH, Hickey RD, et al. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature* 2010;467:707–10. doi:10.1038/nature09414
- 50 Fortier M, Celton-Morizur S, Desdouets C. Incomplete cytokinesis/binucleation in mammals: The powerful system of hepatocytes. *Methods Cell Biol* 2017;137:119–42. doi:10.1016/bs.mcb.2016.04.006
- 51 Mokrani-Benhelli H, Gaillard L, Biasutto P, et al. Primary microcephaly, impaired DNA replication, and genomic instability caused by compound heterozygous ATR mutations. *Hum Mutat* 2013;34:374–84. doi:10.1002/humu.22245
- 52 Aguilera A, García-Muse T. Causes of genome instability. *Annu Rev Genet* 2013;47:1–32. doi:10.1146/annurev-genet-111212-133232
- 53 Gaillard H, García-Muse T, Aguilera A. Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15:276–89. doi:10.1038/nrc3916
- 54 Magdalou I, Lopez BS, Pasero P, et al. The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Semin Cell Dev Biol* 2014;30:154–64. doi:10.1016/j.semcdb.2014.04.035

- 55 Techer H, Koundrioukoff S, Nicolas A, et al. The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. *Nat Rev Genet* 2017;18:535–50. doi:10.1038/nrg.2017.46
- 56 Saldivar JC, Cortez D, Cimprich KA. The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;18:622–36. doi:10.1038/nrm.2017.67
- 57 Toledo LI, Altmeyer M, Rask M-B, et al. ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* 2013;155:1088–103. doi:10.1016/j.cell.2013.10.043
- 58 Feaver RE, Cole BK, Lawson MJ, et al. Development of an in vitro human liver system for interrogating nonalcoholic steatohepatitis. *JCI Insight* 2016;1:e90954. doi:10.1172/jci.insight.90954
- 59 Michaut A, Le Guillou D, Moreau C, et al. A cellular model to study drug-induced liver injury in nonalcoholic fatty liver disease: Application to acetaminophen. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016;292:40–55. doi:10.1016/j.taap.2015.12.020
- 60 Malehmir M, Pfister D, Gallage S, et al. Platelet GPIIb/IIIa is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer. *Nat Med* 2019;25:641–55. doi:10.1038/s41591-019-0379-5
- 61 Poli J, Tsaponina O, Crabbé L, et al. dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *EMBO J* 2012;31:883–94. doi:10.1038/emboj.2011.470
- 62 Coquel F, Silva M-J, Técher H, et al. SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction. *Nature* 2018;557:57–61. doi:10.1038/s41586-018-0050-1
- 63 Li T, Chen ZJ. The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. *J Exp Med* 2018;215:1287–99. doi:10.1084/jem.20180139
- 64 Schults MA, Nagle PW, Rensen SS, et al. Decreased nucleotide excision repair in steatotic livers associates with myeloperoxidase-immunoreactivity. *Mutat Res* 2012;736:75–81. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.11.001
- 65 López-Contreras AJ, Fernandez-Capetillo O. The ATR barrier to replication-born DNA damage. *DNA Repair* 2010;9:1249–55. doi:10.1016/j.dnarep.2010.09.012
- 66 Orvain C, Lin Y-L, Jean-Louis F, et al. Hair follicle stem cell replication stress drives IFI16/STING-dependent inflammation in hidradenitis suppurativa. *J Clin Invest* 2020;130:3777–90. doi:10.1172/JCI131180
- 67 Ragu S, Matos-Rodrigues G, Lopez BS. Replication Stress, DNA Damage, Inflammatory Cytokines and Innate Immune Response. *Genes* 2020;11. doi:10.3390/genes11040409
- 68 Schild-Poulter C, Su A, Shih A, et al. Association of autoantibodies with Ku and DNA repair proteins in connective tissue diseases. *Rheumatol Oxf Engl* 2008;47:165–71. doi:10.1093/rheumatology/kem338

- 69 Zeman MK, Cimprich KA. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 2014;16:2–9. doi:10.1038/ncb2897
- 70 Bester AC, Roniger M, Oren YS, et al. Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* 2011;145:435–46. doi:10.1016/j.cell.2011.03.044
- 71 Chabosseau P, Buhagiar-Labarchède G, Onclercq-Delic R, et al. Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nat Commun* 2011;2:368. doi:10.1038/ncomms1363
- 72 Schoggins JW, MacDuff DA, Imanaka N, et al. Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* 2014;505:691–5. doi:10.1038/nature12862
- 73 Tan X, Sun L, Chen J, et al. Detection of Microbial Infections Through Innate Immune Sensing of Nucleic Acids. *Annu Rev Microbiol* 2018;72:447–78. doi:10.1146/annurev-micro-102215-095605
- 74 Luo X, Li H, Ma L, et al. Expression of STING Is Increased in Liver Tissues From Patients With NAFLD and Promotes Macrophage-Mediated Hepatic Inflammation and Fibrosis in Mice. *Gastroenterology* 2018;155:1971-1984.e4. doi:10.1053/j.gastro.2018.09.010
- 75 Wang X, Rao H, Zhao J, et al. STING expression in monocyte-derived macrophages is associated with the progression of liver inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 2020;100:542–52. doi:10.1038/s41374-019-0342-6
- 76 Yang Y-G, Lindahl T, Barnes DE. Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell* 2007;131:873–86. doi:10.1016/j.cell.2007.10.017
- 77 Yu Q, Katlinskaya YV, Carbone CJ, et al. DNA-damage-induced type I interferon promotes senescence and inhibits stem cell function. *Cell Rep* 2015;11:785–97. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.069
- 78 Ahn J, Xia T, Konno H, et al. Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. *Nat Commun* 2014;5:5166. doi:10.1038/ncomms6166
- 79 Kwon J, Bakhoun SF. The Cytosolic DNA-Sensing cGAS-STING Pathway in Cancer. *Cancer Discov* 2020;10:26–39. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0761
- 80 Patouraux S, Rousseau D, Bonnafous S, et al. CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2017;67:328–38. doi:10.1016/j.jhep.2017.03.003
- 81 Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatol Baltim Md* 2012;56:1751–9. doi:10.1002/hep.25889
- 82 Gripon P, Rumin S, Urban S, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15655–60. doi:10.1073/pnas.232137699

- 83 Lebofsky R, Bensimon A. DNA replication origin plasticity and perturbed fork progression in human inverted repeats. *Mol Cell Biol* 2005;25:6789–97. doi:10.1128/MCB.25.15.6789-6797.2005
- 84 Michalet X, Ekong R, Fougerousse F, et al. Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* 1997;277:1518–23.
- 85 Rimmele P, Komatsu J, Hupe P, et al. Spi-1/PU.1 oncogene accelerates DNA replication fork elongation and promotes genetic instability in the absence of DNA breakage. *Cancer Res* 2010;70:6757–66. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4691
- 86 Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, et al. OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol* 2014;2:457–65. doi:10.1016/j.redox.2013.12.020
- 87 Mackay GM, Zheng L, van den Broek NJF, et al. Analysis of Cell Metabolism Using LC-MS and Isotope Tracers. *Methods Enzymol* 2015;561:171–96. doi:10.1016/bs.mie.2015.05.016
- 88 Chong J, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Metabolomics Data Analysis, Interpretation, and Integration with Other Omics Data. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2020;2104:337–60. doi:10.1007/978-1-0716-0239-3_17

MATERIAL and METHOD

Human Material

For transcriptomic analysis: Twenty-seven morbidly obese patients were recruited through the Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation (Nice hospital) and where they underwent bariatric surgery for their morbid obesity (**Table 2**) in accordance with French guidelines. Exclusion criteria were: presence of a hepatitis B virus or hepatitis C virus infection, excessive alcohol consumption (>20g/day) or another cause of chronic liver disease as described [80]. Before surgery, fasting blood samples were obtained and used to measure alanine and aspartate transaminases (ALT and AST, respectively), glucose, insulin and HbA1c. Insulin resistance was calculated using the homeostatic model assessment (HOMA-IR) index. Surgical liver biopsies were obtained during surgery and no ischemic preconditioning had been performed. Hepatic histopathological analysis was performed according to the scoring system of Kleiner et al.[11] For metabolomics analysis: Eight NAFLD patients were recruited through the Department of Digestive Surgery and Hepatology (Beaujon hospital); where they underwent resection for HCC (**Table 1**). Exclusion criteria were same as Nice Hospital. For each patient a SAF score (steatosis, activity, fibrosis) summarizing the main histological lesions was defined [81]. Also, the NAS score was attributed according to Kleiner et al. [11]. Control patients (n=5) underwent liver resection for benign tumors. All subjects gave their informed written consent to participate in this study in accordance with French legislation regarding Ethics and Human Research (Huriet-Serusclet law). The “Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Nice” approved the study (07/04:2003, N° 03.017) and Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (DC-2009-936)

Mice models

C57BL/6J lean male mice were purchased from Janvier Laboratories at 4 weeks of life and housed in a temperature-controlled environment with 12-hour-light/dark cycles. All animals had free access to water and standard diet (SD) (R04-10, Safe), providing 60% carbohydrate, 3% fat and 16% protein in terms of energy. After one week, 5-week-old C57BL/6J mice were assigned randomly to 3 groups fed for 6 months with SD or High-Fat High-Sucrose diet (HFHS) (U8954P Version 014, Safe), providing 50% carbohydrate, 23% fat, and 17% protein in terms of energy, or a Choline–Deficient High-Fat Diet (CDHFD) (D05010402i, Research Diets), providing 42% carbohydrate, 24% fat, and 24% protein without choline. Body weight was monitored monthly. For *in vivo* experiments, animals were humanely euthanized and livers were harvested. One part of the liver was fixed in phosphate-buffered 10% formalin for histological analyses and the remaining tissue was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until processing. The NAS score was evaluated according to the scoring system of Kleiner et al. [11]. Mice received care in compliance with institutional guidelines regulated by “Direction départementale de la protection des populations”, France (authorization number 13996).

Cell isolation and culture of murine primary hepatocytes

Hepatocytes were isolated from mouse livers by *in situ* perfusion and were seeded in complete medium, as described previously [50]. Hepatocytes were isolated from 7-month-old SD or NAFLD mice (HFHS or CDHFD, following 6 months of diet). Cell viability after liver perfusion was equivalent ($\geq 70\%$) in all mouse models. After cell spreading, the culture medium (William’s #32551087) was deprived of fetal bovine serum. Proliferation (S phase synchronization) was induced with 50 ng/mL mitogenic EGF (Merck #E4127) and 20 mM of pyruvate sodium (Merck

#P4562). For rescue experiments, 20 μ M of each dNTPs/nucleotide (dATP, dCTP, dGTP and Thymidine) was added. dCTP (Merck D0776) was solubilized in 1 M NaOH (100 mM). dATP (Merck D8668) was solubilized in 0.1 M NaOH (20 mM). Thymidine (Merck T1895) was solubilized in H₂O (50 mM). dGTP (Merck D7145) was solubilized in 1 M NH₄OH (100 mM). Half of the primary culture was treated twice with 20 μ M of the nucleotide mixture at 36h and 48h of culture time. The other half was treated with the same amount of resuspension buffer without nucleotides. Incorporation of the thymidine analogue (BrdU; Merck #11296736001) was used as an index of replication between 48h and 60h.

HepaRG culture and in vitro fatty acid uptake

HepaRG human (Biopredic, Rennes, France) were cultured at 37°C and 5% CO₂ in a humidified incubator. HepaRG were differentiated with DMSO (Merck #D2650) and cultivated, as described previously [82], including a 2 week incubation with 10% fetal bovine serum, 5 μ g/mL of human insulin (Merck # I9278), 5 $\times 10^{-7}$ M hydrocortisone hemisuccinate (Merck #1319002) and 1.8% dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck #D2650) for the induction of differentiation into hepatocyte-like cells. When cells were confluent, medium was changed with only 2% fetal bovine serum, and cells were treated during 4 days with fatty acids (66 μ M of sodium oleate (Merck #O3880) and 33 μ M of sodium palmitate (Merck P9767)). Then, cells were trypsinized and plated (300 000 cells per plate) to induce proliferation. Experiments were performed 48 hours later. To assess intracellular neutral lipid, HepaRG cells were fixed using 4% paraformaldehyde during 20 minutes and stained using Oil-Red-O solution (Merck # O0625) for 25 minutes at room temperature, followed by Hoechst staining during 10 minutes. Lipid accumulation was quantified using Image J. The quantified area of Oil Red O staining was reported to the cell number thanks to Hoechst staining.

Gene expression analysis and microarray

For mouse samples, total RNA from mouse primary hepatocyte cultures was extracted using Trizol Reagent (ThermoFischer Scientific #15596018). Sample concentration and purity were determined and then reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse-Transcription Kit. Quantitative PCR (q-PCR) was performed using a SYBR Luminaris Color HiGreen qPCR master mix and specific primers (Supplementary Table 1) on 100 ng total RNA (ThermoFisher Scientific #4368813). The reactions were performed in 96-well plates in a LightCycler CFX connect (Biorad) during 40 cycles with SYBR Luminaris Color HiGreen qPCR master mix (ThermoFisher Scientific #K0394). The relative amount of mRNAs was calculated using the Ct method, with LightCycler CFX analysis software, and normalized to the expression of 18S mRNA. For microarray analysis, all RNA processing steps, microarrays and statistical analysis were carried out by the Genom'IC facility (Institut Cochin, INSERM U1016, Paris, France). RNA quality was checked with a Bioanalyzer 2100 (with the Agilent RNA6000 pico chip kit). Reverse transcription was carried out on 400 pg of total RNA, following the Ovation Pico WTA System V2 (Nugen). Sens Target DNA (5 µg) were then hybridized to GeneChip® MTA1.0 (Affymetrix), washed and finally scanned using the GCS3000 7G. The scanned images were then analyzed with Expression Console software (Affymetrix) to obtain raw data (CEL Intensity files) and metrics for Quality Controls. A two-way analysis of variance (ANOVA) was applied to identify genes differentially expressed between the groups (SD vs HFHS or SD vs CDHFD) and fold changes were used to filter and select differentially expressed genes (>1.2). Global analysis was carried out by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). GSEA was performed using the fgsea package in R in order to identify gene sets overrepresented among up- and down-regulated genes. Human and murine gene sets were obtained from the Molecular Signatures Database (MSigDB) using the msigdb package (version 6.2.1) Using a statistical analysis, the nominal p

value and false discovery rate (q value) were defined, based on 1,000 random permutations between the different GeneSets studied. According to the software developers, results were significant for p value < 0.05 and q value < 0.25 (false discovery rate below 25%). Data are accessible on GEO #GSE154194.

For Human cohort, total liver RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (74104, Qiagen, Hilden, Germany) and treated with Turbo DNA-free (AM 1907, Thermo Fisher scientific Inc.) following the manufacturer's protocol. The quantity and quality of the RNAs were determined using the Agilent 2100 Bioanalyzer with RNA 6000 Nano Kit (5067-1511, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Total RNA (1 µg) was reverse transcribed with a High-Capacity DNA Reverse Transcription Kit. Real-time quantitative PCR was performed in duplicate for each sample using the StepOne Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher scientific Inc.). TaqMan gene expression assays were purchased from Thermo Fisher Scientific Inc. (RPLP0: Hs99999902_m1; MB21D1/Cgas: Hs00403553_m1; TMEM173/STING-Hs00736955_g1). Gene expression was normalized to the housekeeping gene RPLP0 (Ribosomal Phosphoprotein Large P0, mouse and human) and calculated based on the comparative cycle threshold Ct method. Statistical significance of differential gene expression between two study groups was determined using the nonparametric Mann–Whitney test. Correlations were analyzed using the Pearson's correlation test. p < 0.05 was considered as significant.

***In vivo* histochemistry**

Mouse livers were fixed overnight in 10% neutral buffered formalin and then transferred in 70% ethanol for 24 hours, embedded in paraffin blocks, and finally cut in 3-µm-thick sections. After drying overnight at 37°C, liver sections were subsequently stained with Haematoxylin-Eosin-Saffron (HES) by an automated slide stainer (Thermo Fisher Scientific VARISTAIN Gemini

ES). Histological grading was determined based on accepted human histopathological criteria for NAFLD. For PCNA/ γ H2AX staining: Liver sections (5 μ m) were deparaffinized and incubated in citrate buffer at 95°C for 20min for antigen retrieval. Sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies including anti- γ H2AX (1:200 dilution) and anti-PCNA (1:200 dilution) (See Supplementary Table 2). Anti-mouse or anti-rabbit IgG antibodies (1:500) conjugated with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher) were used as secondary antibodies. Hoechst 33342 (0.2 μ g/mL; Merck #H3570) was included in the final wash to counterstain nuclei. All images were collected with the slide imager Zeiss Axio Scan Z1. At least 80 PCNA+ hepatocytes were analyzed regarding their γ H2AX positivity in at least 3 different lobes per animal (when possible).

RNA *in situ* hybridization (RNAscope)

RNA *in situ* hybridization was done on freshly cut 5 μ m FFPE liver using the RNAscope 2.5 HD Duplex Kit (#322371), with HybEZ II hybridization system, following the manufacturer's instructions (Advanced Cell Diagnostics, Bio-Techne). The following RNAscope probe was used: RNAscope® Probe - Mm-Tmem173 - Mus musculus transmembrane protein 173 (Tmem173) mRNA (#413321). For the quantification, the number of dot (0, 1, 2, >3) have been counted in 500 hepatocytes per animal, localized in at least 10 different areas along the centro-lobular axis.

DNA combing

Primary cultures were sequentially labeled with 25 μ M of CldU (Merck #C6891) and then 25 μ M of IdU (Merck #I7125) for 30 minutes, each, as previously described [83]. Cells were harvested and embedded in low-melting agarose plugs (from Comet assay kit) in which DNA

was subjected to deproteinization by proteinase K treatment (ThermoFisher Scientific #100005393). Agarose was then removed by digestion with agarase and the high molecular DNA yielded was used for combing as previously described [84] by using the FiberComb® Molecular Combing System (Genomic Vision). CldU and IdU was respectively stained with rat anti-BrdU and mouse anti-BrdU antibodies, followed by staining with anti-rat Cy5 and anti-mouse Cy3.5 (See Supplementary Table 2). DNA fibers were counterstained with anti-ssDNA antibodies to distinguish fork pausing/stalling from fiber breakage. DNA fibers were visualized using the FiberVision® scanner (Genomic Vision). Data analysis was performed as described [85].

Comet assay

The Comet assay was performed by using the Oxiselect STA-351 kit (Cell Biolabs #STA-351). Individual hepatocytes were mixed with molten agarose before application to the OxiSelect™ Comet Slide. Embedded cells were treated with the lysis buffer during 1 hour at 4°C and then treated with the alkaline solution during 30 minutes at 4°C. Finally, slides were electrophoresed in a horizontal chamber during 30 minutes in the alkaline solution at 300 mA and 25 volts. DNA was then stained with the DNA dye and visualized by epifluorescence microscopy. Quantification was performed by using the “OpenComet” open-source software tool [86] for Image J, and by following the published instruction. Images were taken using a Nikon Statif Eclipse E600 microscope with x10 magnification, a DXM1200 cooled CCD camera (Nikon), and ACT-1 (version 2.63; Universal Imaging).

Metabolomic analyses by LC-MS

Metabolomic analyses were performed as previously described by Liquid Chromatography - Mass spectrometry (LC-MS) [87]. Briefly, extraction solution used was 50% methanol, 30% ACN, and 20% water. The volume of extraction solution added was calculated from the weight of powdered tissue (30 mg: *in vivo* mouse and human livers) or from the number of cells for each condition (primary cultures). After addition of extraction solution, samples were vortexed for 5 minutes at 4 °C, and then centrifuged at 16,000 g for 15 minutes at 4 °C. The supernatants were collected and analyzed by LC-MS using SeQuant ZIC-pHilic column (Merck) for the liquid chromatography separation. Mobile phase A consisted of 20 mM ammonium carbonate plus 0.1% ammonia hydroxide in water. Mobile phase B consisted of ACN. The flow rate was kept at 100 mL/min, and the gradient was 0 min, 80% of B; 30 min, 20% of B; 31 min, 80% of B; and 45 min, 80% of B. The mass spectrometer (QExactive Plus Orbitrap, Thermo Fisher Scientific) was operated in a polarity-switching mode and metabolites were identified using TraceFinder Software (Thermo Fisher Scientific). For analyses, metabolomic data were normalized using the sum normalization method. MetaboAnalyst 4.0 software was used to conduct statistical analyses and heatmap generation, and unpaired two-sample t test was chosen to perform the comparisons (SD vs HFHS, SD vs CDHFD) [88]. Quantities of each dNTP were used for histograms and statistical analyses.

Immunoblot analysis

Total proteins were extracted from mouse primary hepatocyte cultures in RIPA buffer (Merck #R0278) containing protease and phosphatase inhibitors (ThermoFischer Scientific #A32965 and Merck #35675). Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay (BCA) (ThermoFisher Scientific #23225). Proteins (25 µg) were denatured in Laemmli buffer

containing 5% β -mercaptoethanol, then separated by SDS-PAGE and blotted by semi-dry blotting (Trans-Blot Turbo Transfer, Bio Rad) onto nitrocellulose membranes (Bio Rad). To ensure equal loading, membranes were stained with Ponceau Red. Membranes were blocked in 5% milk/PBS-Tween (0.1%) for at least 1 hour at room temperature and then incubated at 4°C overnight under shaking conditions with primary antibodies (Supplemental Table 2). Incubation with the secondary antibody (HRP-anti-rabbit or HRP-anti-mouse, 1:2500) was performed under shaking conditions for 1 hour. Detection was achieved with Clarity Western ECL Substrate (Bio Rad) using the iBright CL1500 Imaging system (Thermo Fisher Scientific). In all immunoblotting, HSC70 or total protein were used to normalize the results. For protein quantification, densitometry analysis was performed using Image J. Data are presented as relative units, which represent the densitometric value for the protein of interest normalized to the second protein of interest.

***In vitro* Immunofluorescence**

Primary hepatocytes were fixed in 4% paraformaldehyde during 15 minutes for γ H2AX/pHH3 and 53BP1 stainings or in cold fixative solution (75% ethanol 25% acetic acid) during 20 minutes for the BrdU labeling. The BrdU immunofluorescence was performed with the BrdU Detection Kit I (Roche). Anti-mouse and anti-rabbit IgG antibodies conjugated with Alexa Fluor 488 or 594 were used as the secondary antibodies. Hoechst 33342 (0.2 μ g/mL) was included in the final wash to counterstain nuclei. Images were taken using a Nikon Statif Eclipse E600 microscope with x20 magnification, 1.4–0.7 NA PL-APO objectives, a DXM1200 cooled CCD camera (Nikon), and ACT-1 (version 2.63; Universal Imaging). For BrdU staining, at least 1,000 hepatocytes were counted in at least 10 different areas for each condition. For 53BP1 staining, at least 500 hepatocytes were counted in at least 10 different areas for each condition. For γ H2AX-pHH3

quantification, a semi-automatic method using Image J was applied. Nuclear area was quantified thanks to Hoechst staining. γ H2AX quantification was reported to the nuclear area and a threshold was put in order to differentiate negative from positive nuclei. pHH3 staining indicates G2/M cells and was correlated with γ H2AX quantification.

IFN- β quantification by ELISA

IFN- β was quantified in the total protein extract collected after 36h or 60h of culture (SD, HFHS, CDHFD) and the manufacturer's protocol was followed to measure the concentration of IFN- β (Mouse IFN-beta DuoSet ELISA - R&D Systems # DY8234-05 and #DY008).

Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc.) All data are represented and expressed as mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant. After ensuring that datasets passed the Shapiro-Wilk normality test, comparison between two groups was performed using unpaired two-tailed Student's t-test with Welch's correction in case of unequal variances, as assessed with a F test. Comparison between three groups was conducted with the one-way Analysis of Variance (ANOVA) method with post-hoc Tukey's multiple comparisons test. If the dataset did not pass the normality test, the non-parametric Mann-Whitney U-test and Kruskal-Wallis test with post-hoc Dunn's multiple comparisons test were conducted for the comparison of two or three groups, respectively. A p-value less than 0.05 was considered as statistically significant and represented as follows: *p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001. ****P<0.0001. ns: non-significant.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Pierre Henri Gaillard, Géraldine Gentric, Séverine Celton-Morizur, Jean-Pierre Couty and Saade Kheir for their critical evaluation of the work and to all members of the laboratory for fruitful discussions. We thank the Tumor Biobank of Henri Mondor University Hospital and the Réseau National Centre de Ressources Biologiques (CRB) Foie for contributing to the tissue collection. We also thank the Core facilities of Centre de Recherche des Cordeliers: CHIC (Center of Histology Imaging and Cytometry), CGB (The Genotyping and biochemical facility) and CEF (The Functional Experimentation Centre). We thank also Genomic facility (GENOM'IC) (Institut Cochin, INSERM U1016, Paris, France). The authors are supported by French grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), la Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM: EQU201903007824), the Institut National du Cancer (PRTK-2017, PLBIO18-107), the Agence Nationale de Recherche ANR (ANR-16-CE14 ; ANR-19-CE14-0044-01), Fondation ARC (Association de Recherche sur le Cancer), Ligue Contre le Cancer (comité de Paris), the Cancéropôle Ile-de-France (Emergence 2015), The Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF-SUBV 2017 ; AFEF-SUBV 2019), EVA-Plan Cancer INSERM HTE and the SIRIC CARPEM. R.D. was a recipient of Ministère de la Recherche and Fondation pour la Recherche Médicale (PhD grant) and supported by the EUR G.E.N.E. (reference #ANR-17-EURE-0013) and is part of the Université de Paris IdEx #ANR-18-IDEX-0001 funded by the French Government through its "Investments for the Future" program. P.C. is a recipient of Plan Cancer INSERM (program « Soutien pour la formation à la recherche fondamentale et translationnelle en cancérologie »).

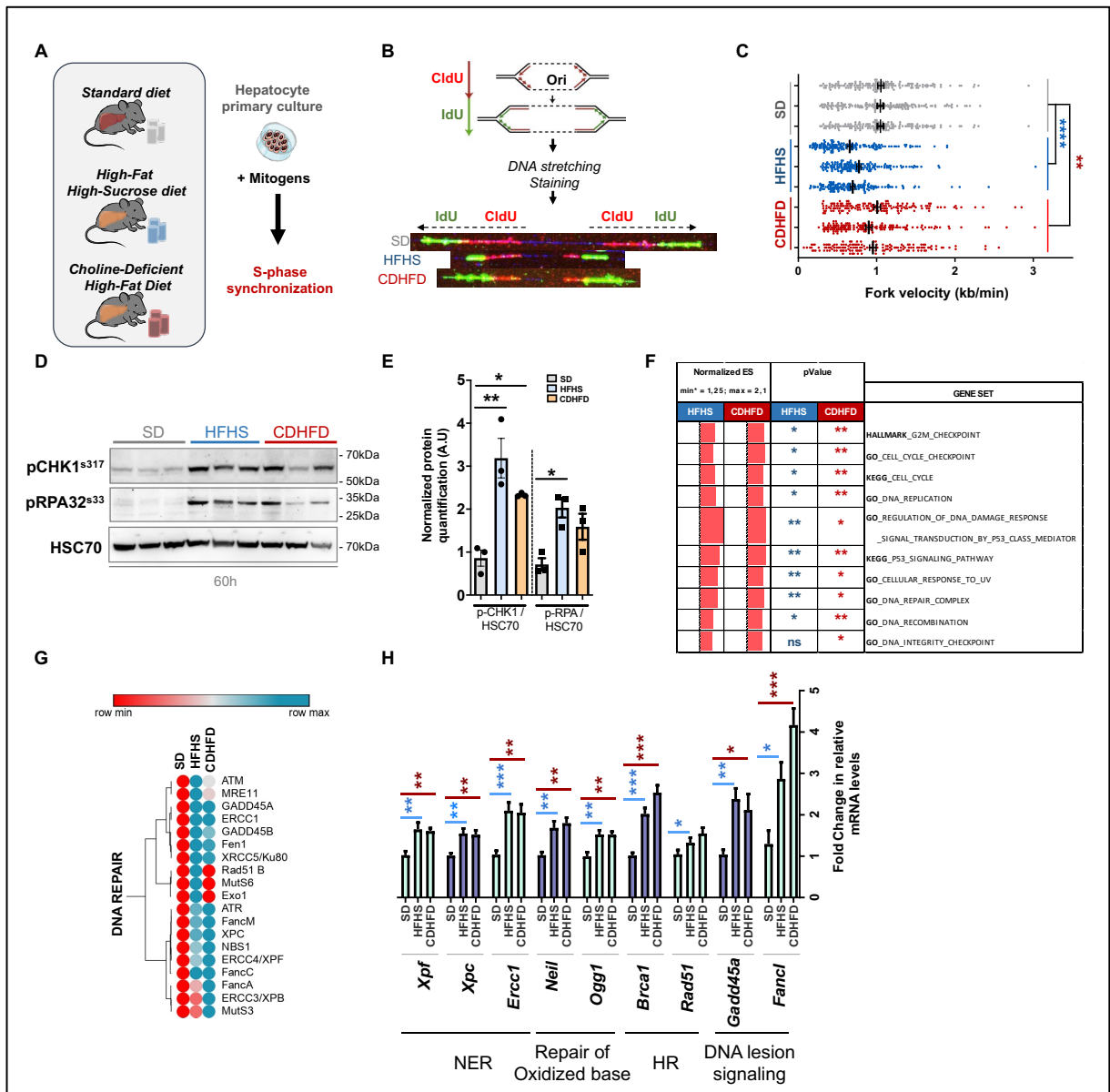


Figure 1 | NAFLD hepatocytes experience replication stress. (A) Experimental procedure. **(B)** (Top) DNA combing method. Dual-pulse labeling (CldU and then IdU, 30 min each) was performed between 47 and 48 hours of culture. (Bottom) Representative images of the DNA combing experiment (magnification, x40). **(C)** Quantification of replication fork speed in three independent experiments, with 150 fibers analyzed per experiment. One-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons. **(D)** Immunoblot analysis of the phosphorylation of CHK1^{s317} and RPA32^{s33}, in primary hepatocyte cultures at 60 hours. HSC70 was used as a loading control. **(E)** Quantification of the levels of p-CHK1^{s317} and p-RPA32^{s33} normalized on HSC70. One-way ANOVA with two-stage comparisons method. ($n=3$ per group) **(F)** Gene set enrichment analysis (GSEA), at 48 hours of culture for proliferating HFHS and CDHFD hepatocytes (normalized against SD with enrichment score [ES] >1.25 (red bars), $n=3$ *ex vivo* cultures per group). The p-value was generated by the software. **(G)** Heat-map showing the enrichment of genes involved in DNA replication and DNA repair in HFHS/CDHFD compared to SD proliferating hepatocytes, extracted from transcriptomic analysis. **(H)** Relative transcript levels (determined by RT-qPCR) for genes involved in different DNA repair and DNA lesion signaling in proliferating SD, HFHS and CDHFD hepatocytes, at 48 hours. The data shown are the means \pm SEM ($n=8$ per group). Blue and red asterisks represent comparisons between HFHS and SD and between CDHFD and SD, respectively. One-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons.

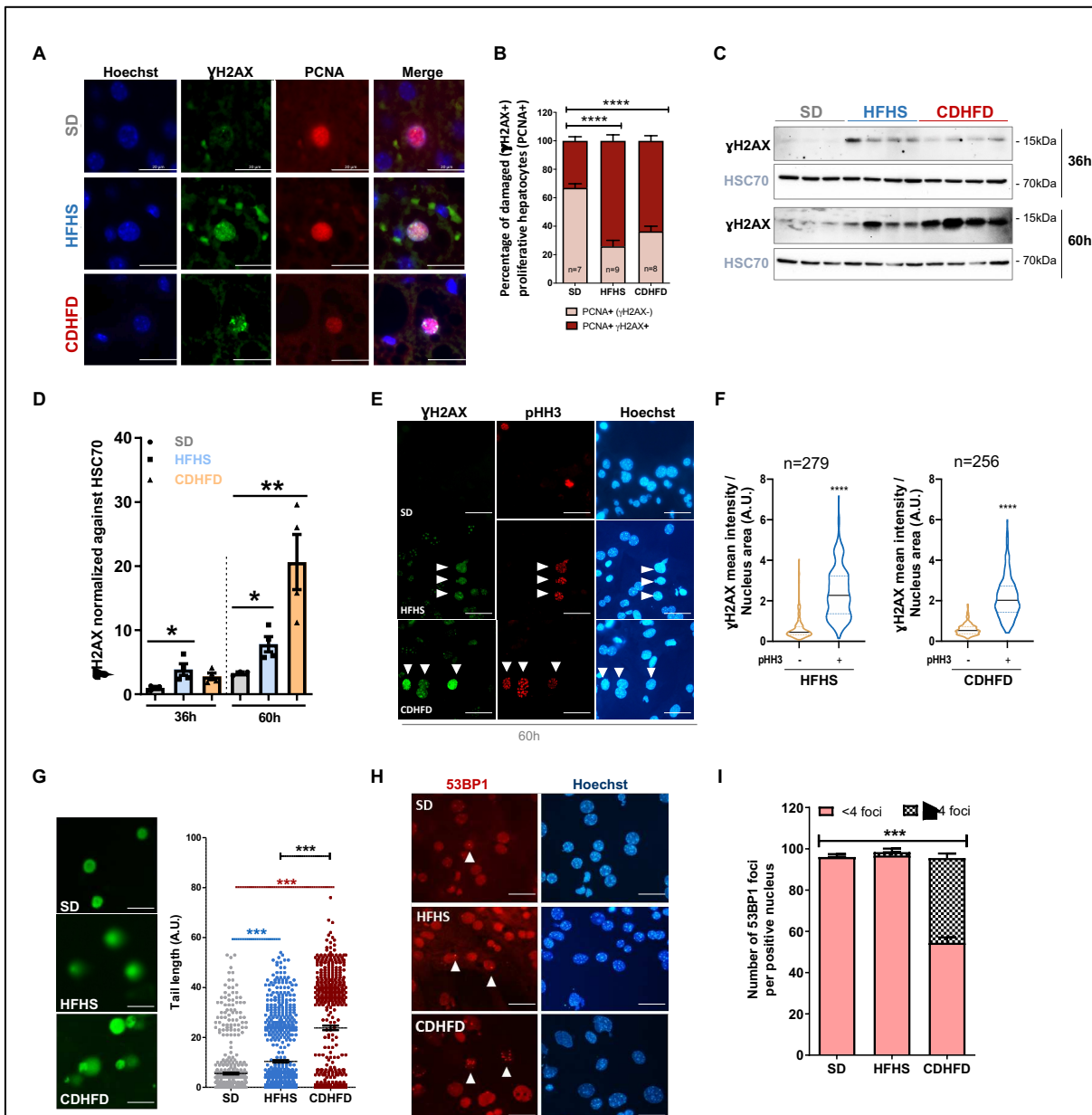


Figure 2 | Replication-associated DNA lesions accumulate in proliferating NAFLD hepatocytes. (A) Immunofluorescence staining for γ H2AX (green) and PCNA (red) with Hoechst counterstaining on liver tissue sections (representative images). Original magnification, $\times 40$. The white bar indicates 20 μ m. ($n = 7$ SD; 9 HFHS and 8 CDHFD) (B) Histogram representing all the PCNA positive cells, positive or not for γ H2AX marker. The PCNA- γ H2AX double-positive hepatocytes indicates damaged proliferative hepatocytes. One-way ANOVA with Tukey's tests for multiple comparisons for each time point. (C) Immunoblot analysis comparing H2AX phosphorylation on the serine 139 residue (γ H2AX) in hepatocytes cultures at 36 and 60 hours. HSC70 was used as a loading control. ($n = 3$ SD; 4 HFHS and 4 CDHFD) (D) Quantification of γ H2AX at 36 and 60 hours. The data shown are the means \pm SEM. One-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons at each time point. (E) Immunofluorescence staining for γ H2AX and pHH3 with Hoechst counterstaining in hepatocytes at 60 hours of culture (representative images). Original magnification, $\times 20$. The white bar indicates 20 μ m. (F) Quantification of γ H2AX staining intensity according to the absence (pHH3-) or presence (pHH3+) of the pHH3 G2/M marker in proliferating NAFLD hepatocytes at 60 hours. Unpaired two-tailed *t*-test, with the mean and quartiles shown as solid and dashed lines, respectively ($n = 3$ per group). ($n = 4$ SD; 4 HFHS and 4 CDHFD) (G) Left panel: Representative COMET images of nuclei pretreated with alkaline solution and subjected to electrophoresis. Original magnification, $\times 10$. The white bar indicates 20 μ m. Right panel: Quantification of the comet tail length ($n = 3$ experiments per group, at least 170 nuclei were analyzed per experiment and per group). The results are presented as the mean \pm SEM. Kruskal-Wallis test with

Dunn's test for multiple comparisons. **(H)** Immunofluorescence staining of 53BP1 with Hoechst counterstaining in SD, HFHS, CDHFD hepatocytes at 60 hours of culture (representative images). Arrowheads mark 53BP1 nuclear foci. Original magnification, $\times 20$. The white bar indicates 20 μm . ($n=3$ experiments per group at least 150 nuclei were analyzed per experiment and per group) **(I)** Quantification of 53BP1 foci distribution (<4 and ≥ 4) in SD, HFHS, CDHFD hepatocytes. Two-way ANOVA test.

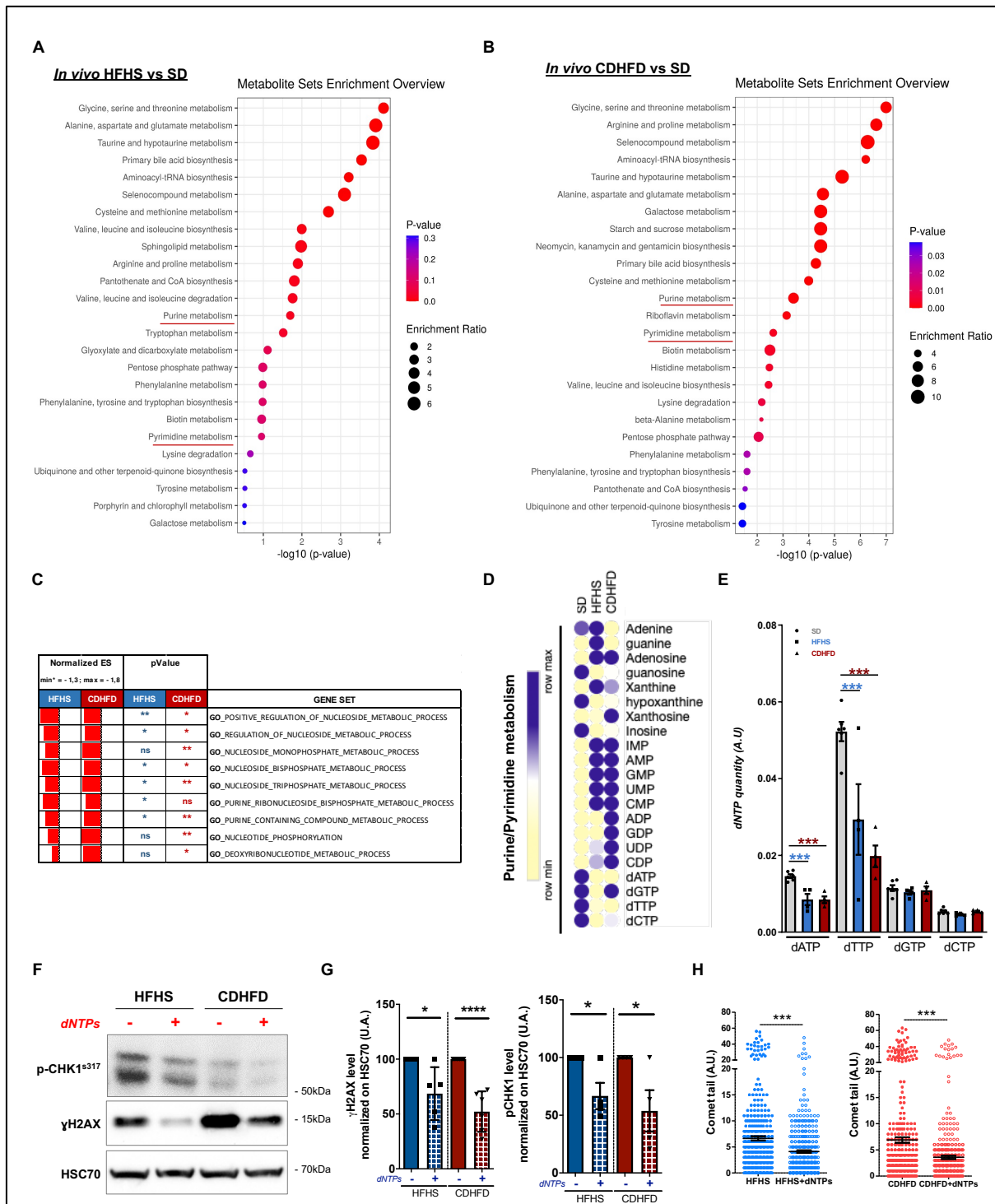


Figure 3 | Replication stress in NAFLD hepatocytes is induced by nucleotide pool imbalance. (A, B) Enrichment map representing fold enrichments and p -values for pathways deregulated in HFHS and CDHFD livers compared to SD livers. Metabolite set enrichment analysis was determined by LC-MS ($n=4$ SD, 5 HFHS and 5 CDHFD). **(C)** GSEA showing the downregulated pathways, which are involved in nucleotide regulation and synthesis, in proliferating HFHS and CDHFD hepatocytes, at 48 hours of culture (normalized against SD with an enrichment score [ES] <-1.3 (red bars), $n=3$ animals per group). The p -value was determined with the GSEA program. **(D)** Heat map showing relative levels of metabolites involved in purine and pyrimidine metabolism. Data were extracted from LC-MS metabolite quantification. **(E)** Relative levels of dNTPs (dATP, dTTP, dGTP and dCTP, respectively) measured by LC-MS. The results are presented as the mean \pm SEM. For each dNTP, one-way ANOVA was performed with Tukey's test for multiple comparisons. **(F)** Representative immunoblot analysis comparing the phosphorylation of H2AX (S139) and CHK1 (S317) in hepatocyte cultures during the

dNTP rescue experiment. For each experiment, 20 μ M of dATP, dCTP, dGTP and thymidine was added at 36 h and 48 h of culture. Proteins were extracted at 60 hours of culture. HSC70 and total CHK1 were used as a loading control (n=6 HFHS and 7 CDHFD). **(G)** Quantification of γ H2AX and pCHK1 was normalized to HSC70 for each hepatocyte culture. The data shown are the means \pm SEM. Unpaired two-tailed *t*-test. **(H)** Quantification of the comet tail. Three dNTP rescue experiments are presented for HFHS and CDHFD primary hepatocytes, with 105 nuclei counted per experiment. Results are presented as the mean \pm SEM and a Mann-Whitney *U* test was performed.

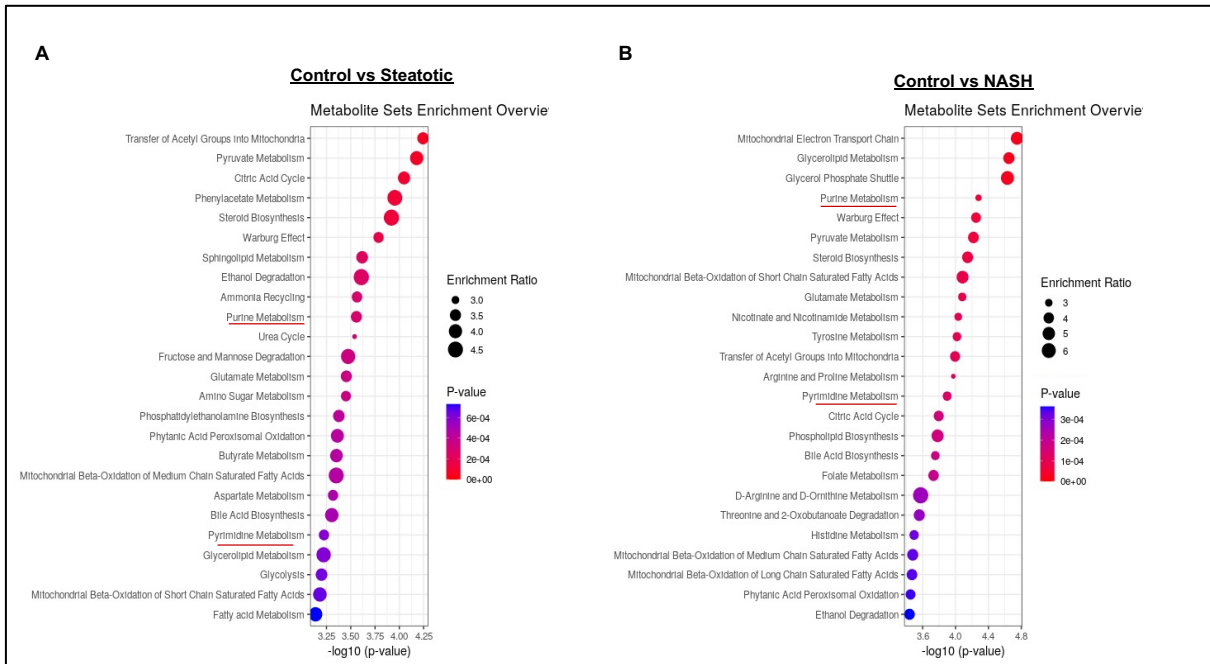


Figure 4 | Human NAFLD livers display alterations to purine and pyrimidine metabolism. Enrichment maps showing fold enrichment and p -values for the metabolic pathways deregulated in the livers of patients with steatosis (A) and NASH (B) relative to control patients. Metabolite set enrichment analysis for the LC-MS experiment was performed with the Metaboanalyst website.

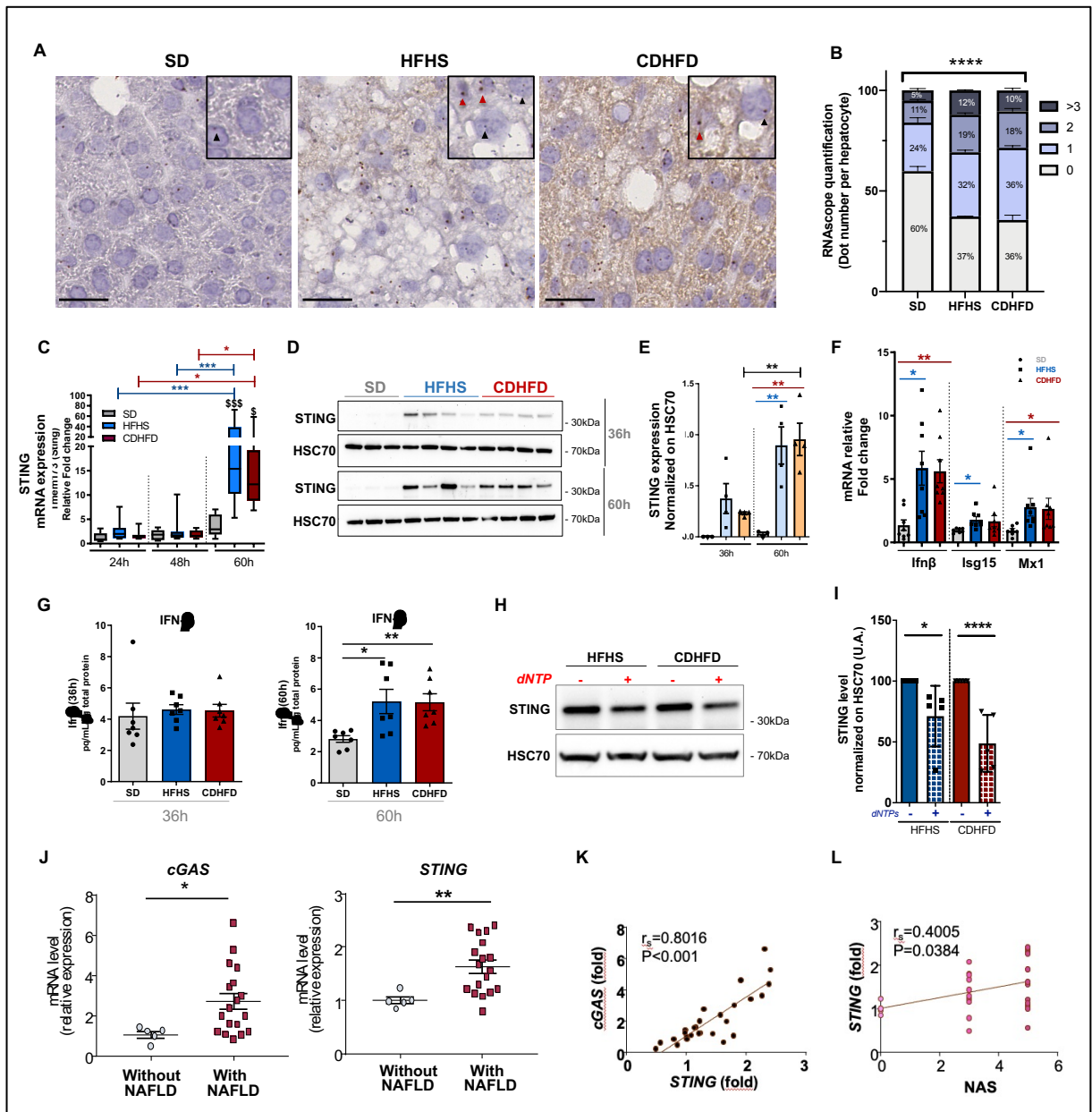


Figure 5 | Replication stress promotes cGAS/STING pathway activation in NAFLD hepatocytes. (A) *In situ* hybridization (RNAscope®) directed against *Sting* mRNA in SD, HFHS and CDHFD livers. The white bar indicates 20 μ m. **(B)** Quantification of the number of dot per hepatocyte only. Two-way ANOVA test. ($n=3$ animals per group, 500 hepatocytes per animal were analyzed). **(C)** RT-qPCR to analyze *Sting* (*Tmem173*) expression during a time-course experiment ($n=8$ per groups), normalized against SD at 24 h. One-way ANOVA with Tukey tests. Asterisks indicate significant differences between time points. Dollar signs indicate significant differences at 60 h of culture. **(D)** Immunoblot analysis comparing the expression of STING at 36 h and 60 h of culture. HSC70 was used as a loading control. **(E)** Quantification of STING levels normalized against HSC70. One-way ANOVA with Tukey tests. **(F)** RT-qPCR analysis of *Ifnβ*, *Isg15* and *Mx1* gene expression at 60 hours of culture. The data shown are the mean \pm SEM ($n=8$ per group) normalized against SD. One-way ANOVA with Tukey tests. **(G)** Quantification of IFN- β protein in cellular extracts by ELISA at 36 and 60 hours ($n=7$ per group). One-way ANOVA with Tukey tests. **(H)** Immunoblot analysis comparing the expression of STING levels in HFHS and CDHFD hepatocyte cultures at 60 h of culture during the dNTP rescue experiment. HSC70 was used as a loading control. **(I)** Quantification of the level of STING; results representative of $n=5$ experiments for each group. Unpaired two-tailed *t*-test. **(J)** RT-qPCR analysis of *cGAS* and *STING* expression in the cohort of obese patients split into two groups: Without NAFLD ($n=5$) and with NAFLD ($n=22$). Unpaired two-tailed *t*-test. **(K)** Linear regression between *cGAS* and *STING* mRNA levels in the cohort of obese patients. **(L)** Linear regression between *STING* expression and NAS score in the cohort of obese patients.

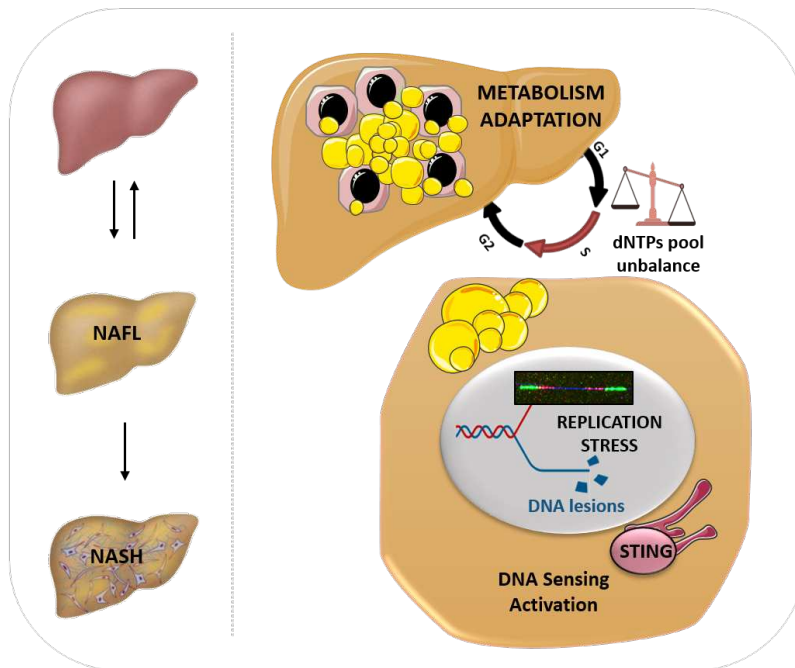
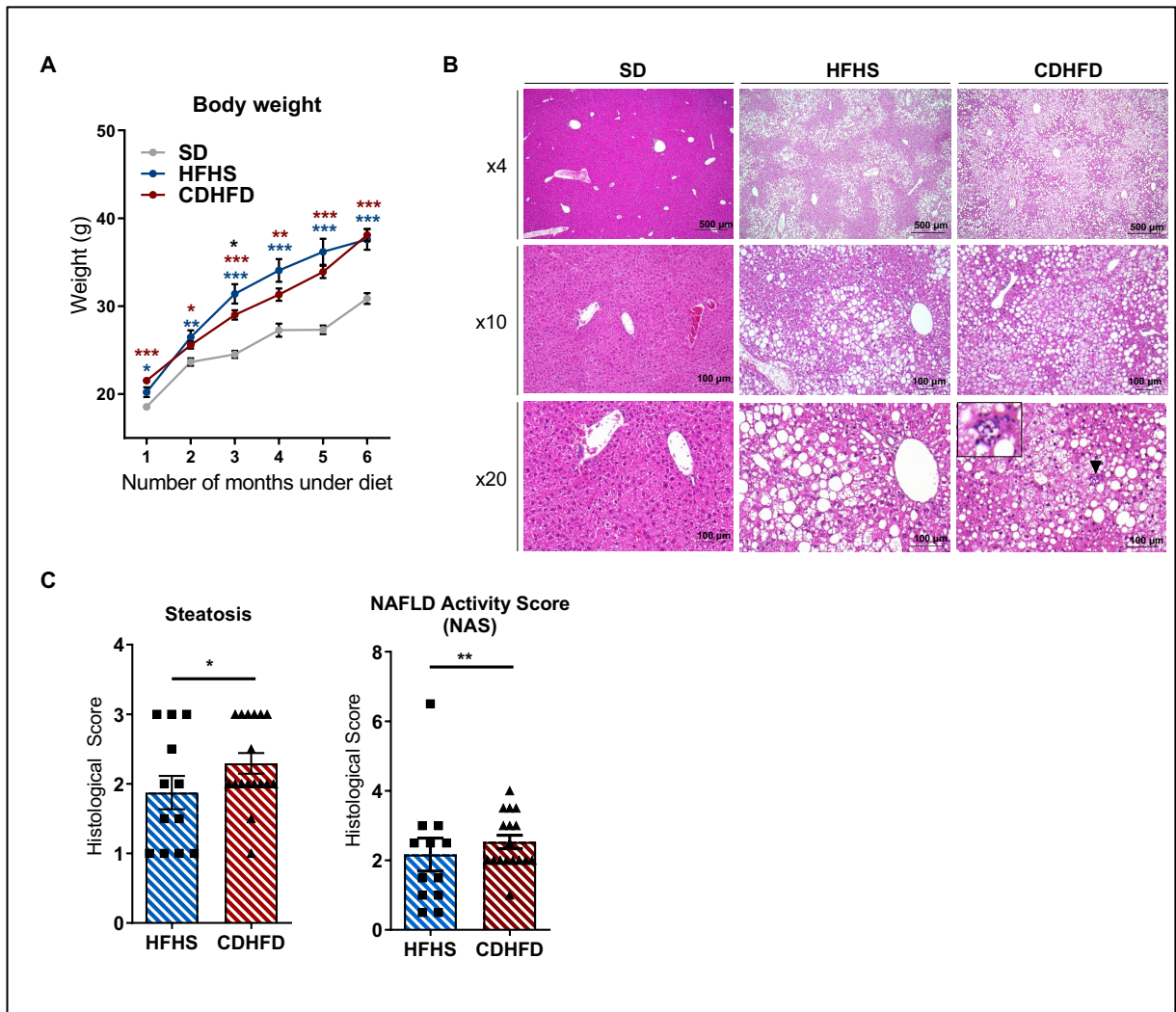
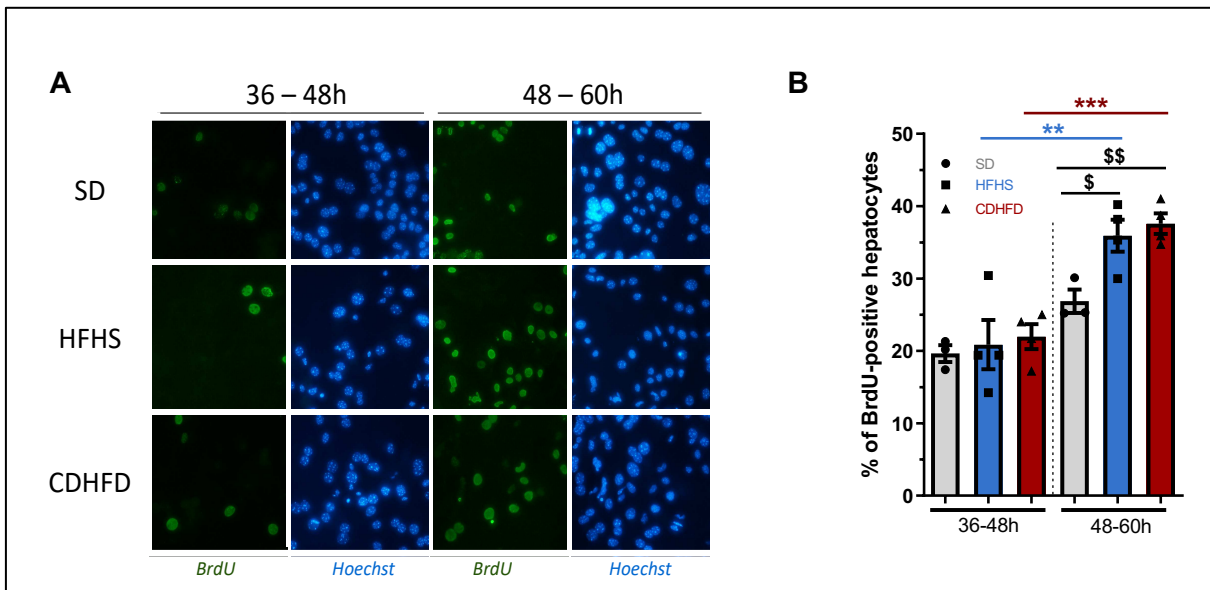


Figure 6 | Graphical abstract

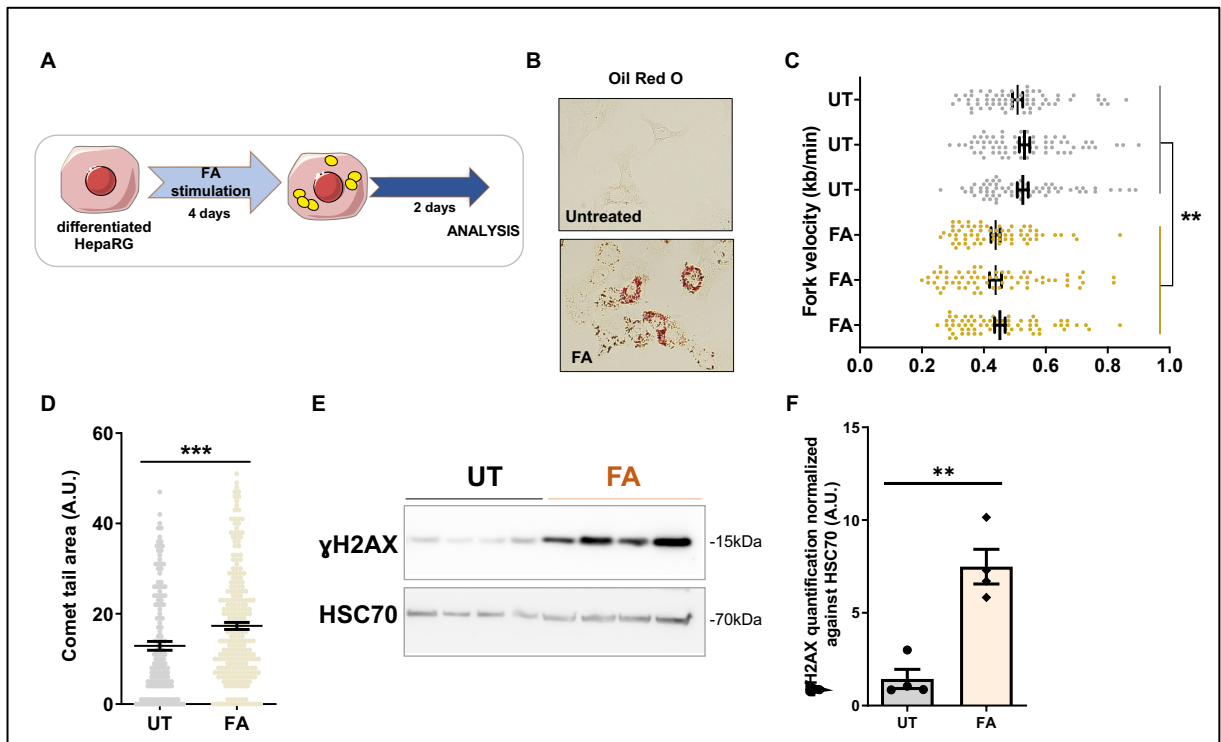
Supplementary informations



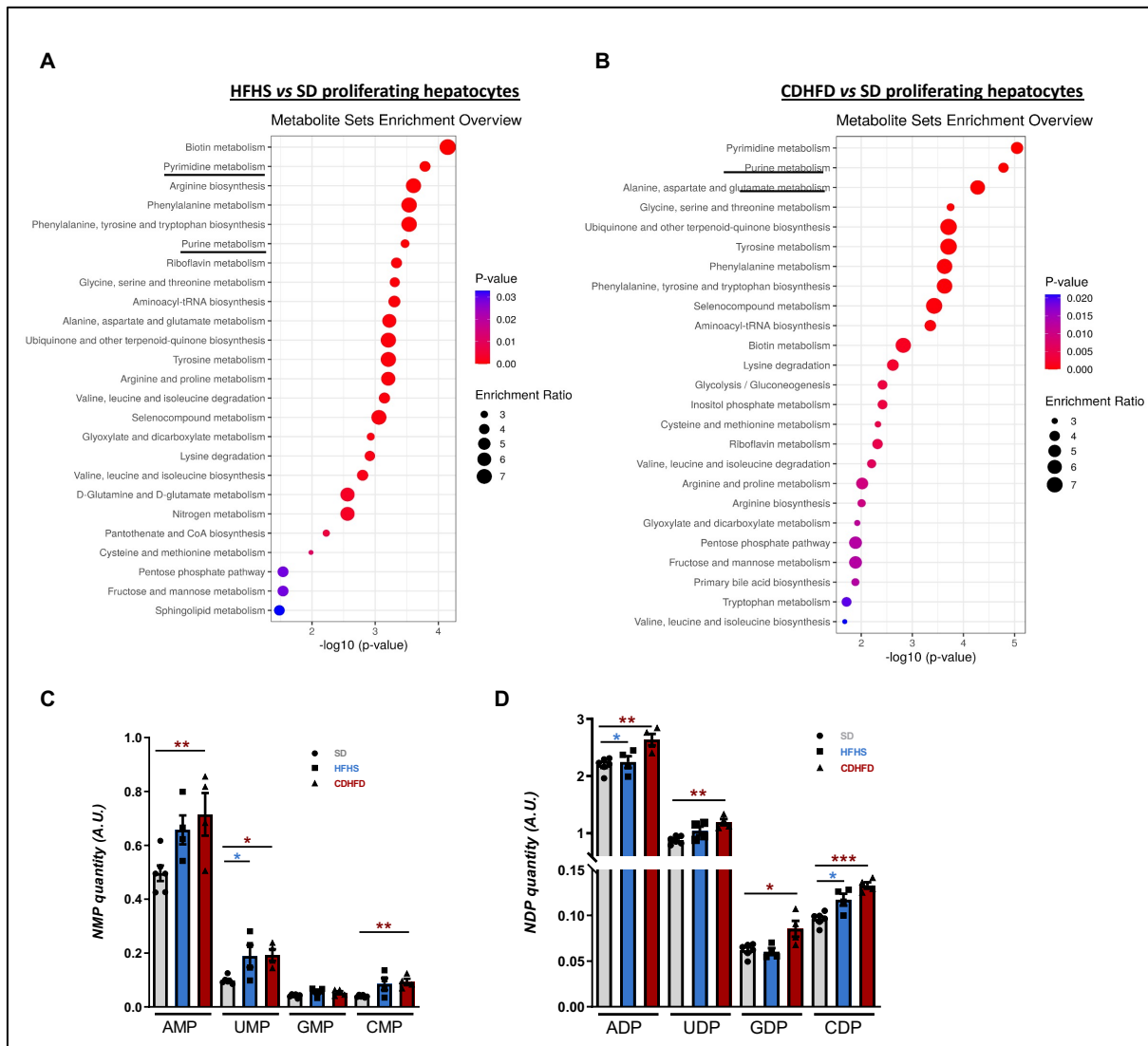
Supplemental Figure 1 (related to Figure 1). Long-term HFHS and CDHFD leads to metabolic syndrome in C57BL/6J mice. **(A)** Weight gain in male C57BL/6J mice fed with SD, HFHS and CDHFD over time. One-way ANOVA test with Tukey's Multiple Comparisons. Blue, Red and black stars indicate statistical comparisons between SD vs HFHS, SD vs CDHFD and HFHS vs CDHFD (n=16 SD, n=12 HFHS, n=17 CDHFD), respectively. **(B)** Hematoxylin-Eosin-Saffron staining on representative liver sections of SD, HFHS and CDHFD C57BL/6J mice illustrating steatosis development. Inset: focus of lobular inflammation as indicated by arrowhead. Original magnification, x4, x10 or x20. **(C)** Histological score for steatosis and NAFLD Activity Score (NAS) were quantified. Data are expressed as the mean \pm SEM for HFHS (n=12) and CDHFD (n=17) mice with unpaired two-tailed t-test.



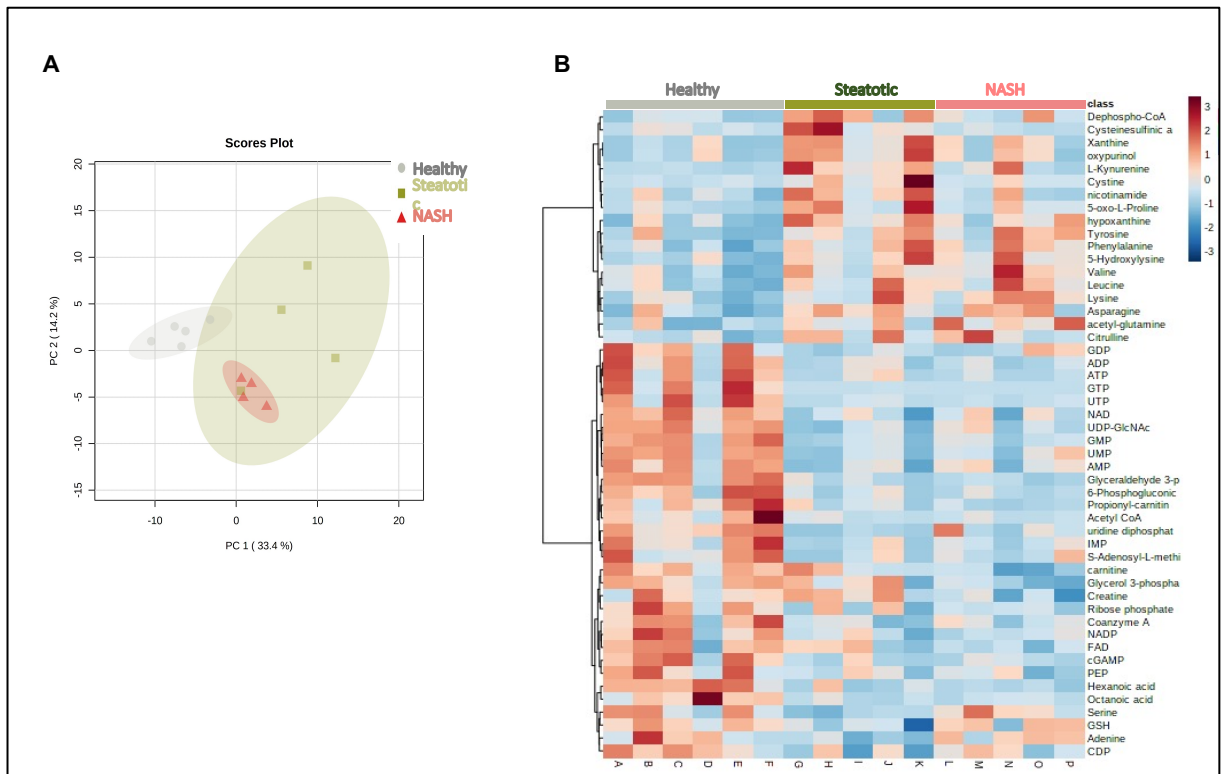
Supplemental Figure 2 (related to Figure 1). Alteration of S phase progression in proliferating NAFLD hepatocytes. (A) Immunostaining of primary hepatocytes with anti-BrdU antibody (green) and Hoechst counterstaining (blue) (original magnification, $\times 20$). BrdU was added between 36 and 48 hours or between 48 and 60 hours of culture. **(B)** Quantitative analysis of BrdU-labeled hepatocytes ($n = 3$ SD, 4 HFHS and 4 CDHFD). The data shown are the means \pm SEM. One-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons. Asterisks indicate significant differences between the different time points. Dollar signs indicate significant differences at 60 h of culture.



Supplemental Figure 3 (related to Figure 2). Lipid overload in human hepatocytes leads to replication stress and DNA damage. (A) To induce steatosis, differentiated confluent HepaRG cells were treated for 4 days with a mixture of palmitic (33 μ M) and oleic acid (66 μ M) (FA-treated). Then, cells were trypsinized and plated again to induce proliferation. (B) Oil Red O staining (red) representing FA uptake by HepaRG. Representative images of 3 independent experiments. (C) Replication fork speed in untreated (UT) and FA condition. 60 fibers were analyzed for each experiment ($n=3$ experiments per group). Data represent the mean \pm SEM. Each mean is indicated on the graph. (D) Quantification of the comet tails. Three representative experiments are presented with at least 50 nuclei counted per experiment. Results are presented as mean \pm SEM. (E) Immunoblot analysis comparing the phosphorylation of H2AX in untreated and FA HepaRG cells. HSC70 was used as a loading control. The immunoblot is representative 4 independent experiments. (F) Quantification of γ H2AX expression in UT and FA condition normalized on HSC70. Data represent the mean \pm SEM.



Supplemental Figure 4 (related to Figure 3). Nucleotide metabolism reprogramming during steatotic hepatocytes proliferation. (A, B) Enrichment-map representing fold enrichment and p-value of deregulated pathways in proliferating HFHS (A) and CDHFD (B) (at 48h of culture). Metabolite set enrichment analysis; from LC-MS experiment was obtained with the Metaboanalyst software. (n=6 SD, 4 HFHS; 4 CDHFD). (C) Relative levels of Nucleoside MonoPhosphate (NMPs: AMP, UMP, GMP and CMP) measured by LC-MS, at 48h of culture. For each NMP, one-way ANOVA test with Tukey's Multiple Comparisons. (D) Relative levels of Nucleoside DiPhosphate (NDPs: ADP, UDP, GDP and CDP) measured by LC-MS. For each NDP, one-way ANOVA test with Tukey's Multiple Comparisons, at 48h of culture.



Supplemental Figure 5 (related to Figure 4). Metabolomic analysis in human NAFLD liver parenchyma. **(A)** PCA plot representing clustering of samples from Healthy, Steatotic and NASH liver tissues used for metabolomic analysis, performed with the Metaboanalyst software. The cohort is described in Supplemental table 1 **(B)** Clustered heat map showing the 50 most dysregulated metabolites, measured by LC-MS and analyzed with the metaboanalyst software.

Supplemental Table 1. qPCR oligonucleotides

Mouse 18S Forward	5'-GTAACCCGTTGAACCCATT	This paper
Mouse 18S Reverse	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG	This paper
Mouse Brca1 Forward	5'-TCCACAGTTCAAAGCACC	This paper
Mouse Brca1 Reverse	5'-TCTTTGTTTCTTCACTGCTACC	This paper
Mouse Ercc1 Forward	5'-CCACAACCTCCATCCAGACT	This paper
Mouse Ercc1 Reverse	5'-CCTGCTGGGGATCTTCA	This paper
Mouse Fancl Forward	5'-CTTTCTAAAATGACAAACCAGCAC	This paper
Mouse Fancl Reverse	5'-TGTCTGATCATCTCGTGGATTT	This paper
Mouse Gadd45a Forward	5'-AGAGCAGAAGACCGAAAGGA	This paper
Mouse Gadd45a Reverse	5'-CGTAATGGTGCCTGACTC	This paper
Mouse Ifn β Forward	5'-GCACTGGGTGGAATGAGACT	This paper
Mouse Ifn β Reverse	5'-AGTGGAGAGCAGTTGAGGACA	This paper
Mouse Isg15 Forward	5'-CAGGACGGTCTTACCCTTCC	This paper
Mouse Isg15 Reverse	5'-AGGCTCGCTGCAGTTCTGTAC	This paper
Mouse Mx1 Forward	5'-GATCCGACTTCACTTCCAGATGG	This paper
Mouse Mx1 Reverse	5'-CATCTCAGTGGTAGTCAACCC	This paper
Mouse Neil Forward	5'-CGCCCATCTACGTTTTTACAC	This paper
Mouse Neil Reverse	5'-TCTACGAAGCAAAGGGCAAG	This paper
Mouse Ogg1 Forward	5'-CCTTATGAAGAGGCCACAA	This paper
Mouse Ogg1 Reverse	5'-GTCAAGGGCCATTAAGCAGA	This paper
Mouse Rad51 Forward	5'-CGAGGGTTCAACACAGACC	This paper
Mouse Rad51 Reverse	5'-CTGTCTACAATAAGCAGTGCATACC	This paper
Mouse Xpc Forward	5'-GATGATGAAGCGTTTCAATAAAGA	This paper
Mouse Xpc Reverse	5'-GATGCTATTTTCGATAGAAGCCACT	This paper
Mouse Xpf Forward	5'-GCAGAAAATAAGGAGAGCGAAG	This paper
Mouse Xpf Reverse	5'-ATCGCTTGACAGATCAGC	This paper

Supplemental Table 2. Antibodies

α -pCHK1 ^{S317} (Immunoblotting)	Cell Signaling Technology	Cat#12302 ; RRID: AB_2783865
CHK1 (immunoblotting)	Cell Signaling Technology	Cat#2360 ; RRID: AB_2080320
α -CldU (rat anti-BrdU) clone BU1/75-ICR (DNA combing)	Abcam	Cat# Ab6326; RRID: AB_305426
α - γ H2AX ^{S139} (Immunostaining)	Merck-Millipore	Cat# 05-636; RRID: AB_309864
α - γ H2AX ^{S139} (Immunoblotting)	Cell Signaling Technology	Cat# 9718; RRID: AB_2118009
α - γ -tubulin (Immunoblotting)	Merck	Cat# T5326; RRID: AB_532292
α -HSC-70 (Immunoblotting)	Santa Cruz Biotechnology	Cat# 7298; RRID: AB_627761
α -IdU (mouse anti-BrdU) (DNA combing)	BD Biosciences	Cat# 347580; RRID: AB_10015219
α -PCNA (Immunostaining)	Cell Signaling Technology	Cat#2586 ; RRID : AB_2160343
α -pHH3 (Immunostaining)	Merck	Cat# 06-570; RRID: AB_310177
α -pRPA ^{S33} (Immunoblotting)	Béthyl	Cat# A300-246A; RRID: AB_2180847
α -ssDNA antibody (DNA combing)	Merck	Cat# MAB3034; RRID: AB_94645
α -STING (Immunoblotting)	Cell Signaling Technology	Cat# 13647; RRID: AB_2732796
α -Mouse IgG (Immunoblotting)	Cell Signaling Technology	Cat# 7076; RRID: AB_330924
α -Rabbit IgG (Immunoblotting)	Cell Signaling Technology	Cat# 7074; RRID: AB_2099233
α -Goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (Immunostaining)	Thermo Fisher Scientific	Cat# A11001; RRID: AB_2534069
α -Goat anti-mouse Alexa fluor 594 (Immunostaining)	Thermo Fisher Scientific	Cat# A11005; RRID: AB_141372
α -Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Immunostaining)	Thermo Fisher Scientific	Cat# A11008; RRID: AB_143165
α -Goat anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Immunostaining)	Thermo Fisher Scientific	Cat# A11012; RRID: AB_141359
α -rat Cy5 (DNA combing)	Abcam	Cat# Ab6565; RRID: AB_955063
α -anti mouse Cy3.5 (DNA combing)	Abcam	Cat# Ab6946; RRID: AB_955045

III. Caractérisation des profils de ploïdie dans le CHC

Lors de mon arrivée, Myriam Bou-Nader, post-doctorante au laboratoire, étudiait le profil de ploïdie hépatocytaire dans les carcinomes hépatocellulaires (CHC) humains. Il était notamment connu des anatomopathologistes que certaines tumeurs semblaient polyploïdes. L'objectif était d'établir un profil de ploïdie en fonction des caractéristiques moléculaires et génomiques de la tumeur. J'ai participé à l'étude en aidant à mettre au point une « macro » capable de quantifier et de cartographier les différents contingents polyploïdes mononucléés. J'ai également participé à la réalisation des manipulations et analyses complémentaires demandées lors de la révision du papier.

Avant de présenter l'étude, il est important d'avoir quelques notions concernant le développement d'un CHC. L'équipe de Jessica Zucman-Rossi a notamment caractérisé d'un point de vue génomique les altérations retrouvées dans ces tumeurs. La réactivation de la télomérase est l'une des premières étapes essentielles à la carcinogenèse (Nault et al., 2013). Chaque CHC présente une quarantaine d'aberrations génomiques qui sont réparties en plusieurs groupes : Mutations affectant la maintenance télomérique, mutations affectant la voie Wnt/ β -caténine, inactivation du gène suppresseur de tumeur p53, mutations affectant le remodelage chromatinien, activation de la signalisation RAS ou encore du stress oxydant (Schulze et al., 2015). Ces études ont permis une classification des CHC maintenant bien répertoriée (Dhanasekaran et al., 2019). Il existe deux groupes principaux représentant les CHC prolifératifs à forte instabilité chromosomique (groupe 1) et les CHC peu prolifératifs stables chromosomiquement (groupe 2). Le premier groupe est divisé en trois sous-groupes (G1, G2 et G3). G1 correspond à des CHC ré-exprimant des marqueurs de gènes fœtaux. G3 est lié à des dérégulations du cycle cellulaire avec notamment la présence de mutations dans le gène *TP53*, et est associé à un mauvais pronostic. Le deuxième groupe est également divisé en trois sous-groupes (G4, G5 et G6). Les groupes G5 et G6 sont eux associés à des mutations somatiques du gène de la β -caténine (*CTNNB1*).

A l'aide d'une collaboration avec l'équipe de Jessica Zucman-Rossi, nous avons reçu des échantillons de 74 patients ayant développé un CHC ainsi que 13 échantillons contrôles. Les 74 patients se répartissent dans les différentes étiologies (Alcool, Hépatite B, Hépatite C,

Syndrome métabolique, etc...) ainsi que dans les différentes signatures mutationnelles évoquées précédemment.

Par ailleurs, il est également important de comprendre comment a été généré la « macro ». Il s'agit avant tout d'un programme ImageJ capable de quantifier et de cartographier les différents contingents hépatocytaires polyploïdes, sur coupes de foie inclus en paraffine. La taille et la circularité de l'ensemble des noyaux sont quantifiées à partir d'un marquage au Hoechst (intercalant de l'ADN permettant de visualiser les noyaux) (Figure 41A). La circularité permet d'éliminer les cellules non-hépatocytaires (circularité <0.8). Ensuite, l'aire de chaque noyau permet d'évaluer le profil de ploïdie. Un histogramme indiquant le nombre de noyau en fonction de l'aire est produit. Quatre gaussiennes sont alors générées. La première définit les cellules immunitaires (circularité >0,8 mais de très petites tailles), et ensuite les trois suivantes définissent respectivement, les noyaux diploïdes, tétraploïdes et octoploïdes (Figure 41B). Le pourcentage des trois gaussiennes est alors quantifié à partir de leurs aires sous la courbe. Enfin, la macro attribue un code couleur aux hépatocytes en fonction de leur ploïdie (2n en violet, 4n en vert et $\geq 8n$ en rouge) et reconstitue la coupe à partir de ce code couleur (Figure 41C). Il est important de noter que seule la ploïdie nucléaire est évaluée. La ploïdie cellulaire (nombre de noyau par cellule) est évaluée manuellement avec en complément un marquage anti- β -caténine permettant de visualiser les membranes. Ainsi, les hépatocytes binucléés (2x2n) apparaissent diploïdes avec la macro.

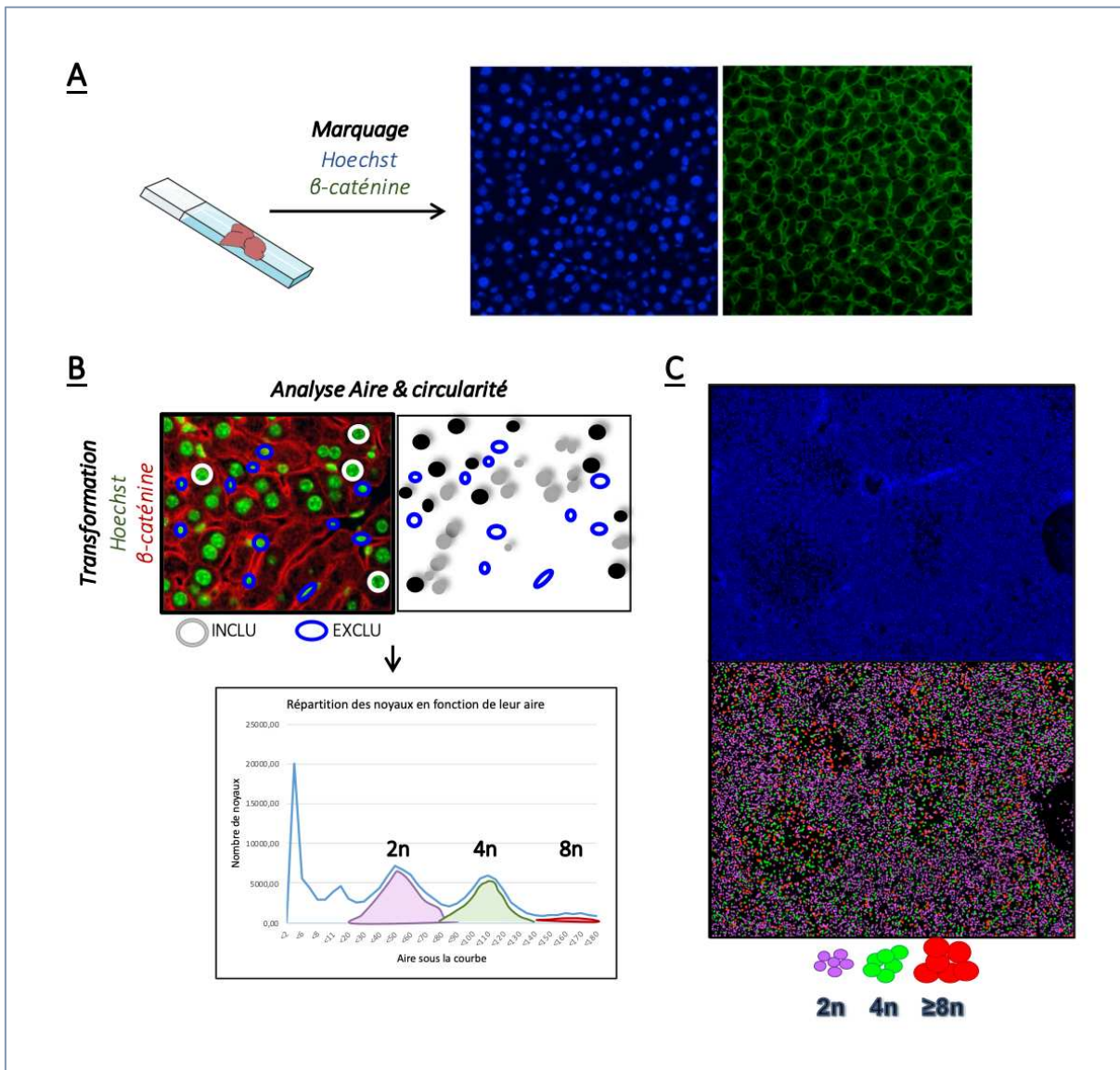


FIGURE 41. PRESENTATION DE LA « MACRO »

A. Sur coupe de paraffine, réalisation d'un marquage Hoechst/anti- β -caténine, qui permet de délimiter le noyau (bleu) et les membranes (vert) respectivement. Grossissement X10. **B.** Le marquage est ensuite scanné afin d'être traité informatiquement. L'image est alors transformée, le marquage Hoechst est converti en pixels noirs. L'aire de chaque noyau est quantifiée à l'aide du marquage. La circularité ($<0,8$) permet d'exclure les cellules non-hépatocytaires. Les noyaux d'hépatocytes sont alors regroupés par aire. Les aires sous la courbe permettent d'approcher des encadrements de valeurs pour chaque population (2n : mauve, 4n : vert, $\geq 8n$: rouge). **C.** La macro attribue un code couleur à chaque population et réalise alors une deuxième image permettant de visualiser, sur la coupe de tissu, la localisation des différentes populations d'hépatocytes.



ORIGINAL ARTICLE

Polyploidy spectrum: a new marker in HCC classification

Myriam Bou-Nader,¹ Stefano Caruso,² Romain Donne,¹ Séverine Celton-Morizur,¹ Julien Calderaro,^{3,4} Géraldine Gentric,^{5,6} Mathilde Cadoux,¹ Antoine L'Hermitte,⁷ Christophe Klein,⁸ Thomas Guilbert,⁹ Miguel Albuquerque,¹⁰ Gabrielle Couchy,² Valérie Paradis,¹¹ Jean-Pierre Couty,¹ Jessica Zucman-Rossi,² Chantal Desdouets²

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2018-318021>).

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Dr Chantal Desdouets, Team Proliferation Stress and Liver Physiopathology, Genome and Cancer, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Paris 75006, France; chantal.desdouets@inserm.fr

RD and SC-M contributed equally.
MB-N and SC contributed equally.

Received 29 November 2018
Revised 25 February 2019
Accepted 24 March 2019

ABSTRACT

Objectives Polyploidy is a fascinating characteristic of liver parenchyma. Hepatocyte polyploidy depends on the DNA content of each nucleus (nuclear ploidy) and the number of nuclei per cell (cellular ploidy). Which role can be assigned to polyploidy during human hepatocellular carcinoma (HCC) development is still an open question. Here, we investigated whether a specific ploidy spectrum is associated with clinical and molecular features of HCC.

Design Ploidy spectra were determined on surgically resected tissues from patients with HCC as well as healthy control tissues. To define ploidy profiles, a quantitative and qualitative *in situ* imaging approach was used on paraffin tissue liver sections.

Results We first demonstrated that polyploid hepatocytes are the major components of human liver parenchyma, polyploidy being mainly cellular (binuclear hepatocytes). Across liver lobules, polyploid hepatocytes do not exhibit a specific zonation pattern. During liver tumorigenesis, cellular ploidy is drastically reduced; binuclear polyploid hepatocytes are barely present in HCC tumours. Remarkably, nuclear ploidy is specifically amplified in HCC tumours. In fact, nuclear ploidy is amplified in HCCs harbouring a low degree of differentiation and *TP53* mutations. Finally, our results demonstrated that highly polyploid tumours are associated with a poor prognosis.

Conclusions Our results underline the importance of quantification of cellular and nuclear ploidy spectra during HCC tumorigenesis.

INTRODUCTION

Polyploidy is the state in which cells contain additional sets of homologous chromosomes. In mammals, whole organism polyploidy is usually lethal; however, some tissues develop a certain degree of polyploidy.^{1,2} Polyploid cells arise through a variety of cell division errors. Defects in mitosis and cytokinesis are thought to be the most common routes, however polyploid cells can also develop as a consequence of chromosome endoreplication (absence of karyogenesis), telomere erosion and oncogene activation.^{1,3,4} Different studies have demonstrated a major role of 'diploid-polyploid conversion' during physiological processes (eg, embryogenesis, terminal differentiation) but also during pathological conditions (eg, mechanical, genotoxic or metabolic stress).^{2,5,6} Alarmingly,

Significance of this study

What is already known on this subject?

- Polyploidy, the existence of cells containing more than two homologous sets of chromosomes, is a well-known feature of mammalian hepatocytes.
- Polyploidy is defined on the basis of the DNA content of each nucleus (eg, 2n, 4n, 8n) called nuclear ploidy and on the number of nuclei per cell called cellular ploidy.
- The liver is the unique organ that modifies its ploidy content during normal homeostasis, regeneration and under damage insults.

What are the new findings?

- Binuclear polyploid hepatocytes are the major components of the polyploid fraction in normal human liver parenchyma.
- Quantification of cellular and nuclear ploidy is sufficient to distinguish between normal liver parenchyma and hepatocellular carcinoma (HCC).
- *TP53* mutation is a factor accounting for a higher percentage of mononuclear polyploid hepatocytes when compared with both *TERT* promoter and *CTNNB1* mutated HCC tumours.
- Highly polyploid HCC tumours are associated with worse prognosis.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- Quantification of cellular and nuclear ploidy spectra could be an accurate test for HCC prognosis.

proliferating polyploid cells have been demonstrated to be genetically unstable and could facilitate tumour development.^{1,7} Accumulating evidence points to a significant contribution of polyploid intermediates in the shaping and the composition of cancer genomes. The majority of solid tumours exhibit polyploid or near polyploid karyotypes.^{8,9}

Polyploidy is a defining feature of the liver.² Polyploid hepatocytes are characterised by the number of nuclei per cell named cellular ploidy (mononuclear/binuclear hepatocytes) as well as the ploidy of each nucleus named nuclear ploidy (diploid, tetraploid,



© Author(s) (or their employer(s)) 2019. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Bou-Nader M, Caruso S, Donne R, et al. *Gut* Epub ahead of print: [please include Day Month Year]. doi:10.1136/gutjnl-2018-318021



octoploid nucleus). In rodents, hepatocytes are mainly tetraploid (binuclear with two diploid nuclei or mononuclear with one tetraploid nucleus) and octoploid (binuclear with two tetraploid nuclei or mononuclear with one octoploid nucleus).¹⁰ During postnatal development, a scheduled division programme characterised by cytokinesis failure results in the genesis of binuclear tetraploid hepatocytes, which subsequently play a pivotal role in liver polyploidisation.^{11,12} This physiological polyploidisation is now considered as a form of liver maturation.^{2,13} Different studies have demonstrated that hepatic polyploidy can be also modified under stress settings as metabolic overload, DNA damage and chemical-induced liver injury.^{14–16} Recently, we identified a new mechanism regulating polyploidy during liver disease, where in the setting of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), nuclear ploidy is altered with the genesis of highly mononuclear polyploid hepatocytes.^{17,18} We demonstrated that this pathological polyploidisation is promoted by endoreplication cycles.^{17,18} Interestingly, endoreplication is now considered as an alternative division programme in a context of genomic stress.³ It is important to note that a long-term consequence of switching to the polyploidisation mode during liver pathological growth is still under debate. Whether or not polyploidy is a risk factor or protective against human liver cancer is largely unknown.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most deadly cancers worldwide and has no effective treatment.¹⁹ More than 90% of HCCs in western countries develop on a cirrhotic background as a result of chronic HBV or HCV infection, high alcohol intake, haemochromatosis or NAFLD. A better understanding of the early events of liver carcinogenesis will help outline the pathogenesis of the disease, and improve diagnostic procedures and curative treatment. In this study, we aimed to determine whether polyploid spectrum could constitute a potent prognostic marker of human HCC.

RESULTS

Hepatocytes become polyploid with no specific zonation in human liver parenchyma

Polyploid hepatocytes have been extensively characterised and recent studies in mouse models have defined their implication in liver homeostasis.^{2,5,13} Data on human hepatic polyploidisation are more limited. In this study, we first investigated whether human liver polyploidy originates from the accumulation of binuclear polyploid hepatocytes and/or the accumulation of mononuclear polyploid hepatocytes. Labelling of nuclear (Hoechst) and plasma membrane (β -catenin/KL1) compartments was performed to investigate cellular ploidy (mononuclear/binuclear fraction) (figure 1A). As previously described, nuclear ploidy was determined by measuring the nucleus area.^{18,20,21} Using a specific imaging program, we assigned a colour code to each nuclei contingent (2n, purple; 4n, green; $\geq 8n$, red), allowing a better visualisation of nuclei within the liver parenchyma (figure 1B). First, we analysed the global ploidy distribution (cellular/nuclear) in normal human liver samples ($n=13$) (table 1). The fractions of 2n, 4n (binuclear $2 \times 2n$, mononuclear 4n) and $\geq 8n$ (binuclear $2 \times \geq 4n$, mononuclear $\geq 8n$) hepatocytes were 73.5 (± 3.12)%, 21.7 (± 2.18)% and 5.43 (± 1.48)%, respectively (figure 1C). We next assessed whether polyploid hepatocytes are preferentially mononuclear or binuclear cells. In normal liver parenchyma, 55% of polyploid hepatocytes are binuclear indicating that cellular ploidy was predominant (figure 1D). Considering the binuclear contingent, we revealed that these hepatocytes were mainly tetraploid (figure 1E). Although the mononuclear

polyploid contingent was also essentially tetraploid, we noticed a specific enrichment of octoploid fraction compared with binuclear population (figure 1E). Finally, we observed that ageing has no effect on both cellular and nuclear ploidy spectra (table 1, online supplementary figure S1).

Studies in rodents have demonstrated that there is a dynamic change in the spatial distributions of polyploid classes across the liver lobule.^{21,22} Here, we investigated whether this was also relevant in human liver parenchyma. Notably, liver zonation is reflected by the heterogeneity of hepatocytes along the porto-central axis of the liver lobules. Importantly, periportal hepatocytes do not express the same metabolic enzymes compared with pericentral hepatocytes.^{23,24} Glutamine synthetase (GS) immunostaining was performed to visualise pericentral hepatocytes (figure 1A). Porto-venous axis was arbitrary separated: centrilobular, mid-lobular and periportal regions (figure 1A). We first observed that a similar proportion of diploid hepatocytes are present in the three regions (figure 1F). Moreover, our analysis showed that neither mononuclear (4n, $\geq 8n$) (figure 1F) nor binuclear ($2 \times 2n$, $\geq 2 \times 4n$) (figure 1G) polyploid hepatocytes have specific zonal distribution in hepatic lobules. Altogether, these findings show that human liver polyploidy is mainly cellular (binuclear fraction) with no specific parenchyma zonation.

Alteration of cellular and nuclear ploidy during liver tumorigenesis

To analyse whether polyploid profile is modified during liver tumorigenesis a cohort of patients surgically treated for HCC was selected (table 2). Out of 75 tumours analysed, 86% were male and 14% were female with the main risk factors being alcohol intake (27%), HBV infection (27%), HCV infection (27%) and metabolic syndrome (16%) (table 2). Tumours were mostly large with a mean of 71 mm and with macrovascular and/or microvascular invasion (53%) (table 2). Regarding tumour differentiation, 18% were well differentiated, 66% moderately differentiated and 16% poorly differentiated (table 2). Finally, in this series of surgically resected HCC, scores of fibrosis in non-neoplastic liver tissue were 27% F0-F1, 36% F2 and 37% F4, respectively (table 2). We first focused to define whether cellular ploidy changes during liver tumorigenesis. For this purpose, we quantified binuclear polyploid hepatocytes in resected HCC livers in both non-tumorous tissue (NTT) and tumorous tissue (TT). Our results showed that binuclear polyploid fraction is drastically reduced in both NTT and HCC TT in comparison to normal liver (figure 2A). This reduction is more pronounced in TT compared with the non-tumorous surrounding tissue (figure 2A). Notably, the ratio between binuclear fractions ($2 \times 2n/2 \times \geq 4n$) was similar between normal liver, NTT and TT (online supplementary figure S2A). We next quantified the percentage of mononuclear fractions. The percentage of mononuclear 2n, 4n and $\geq 8n$ hepatocytes was equivalent in normal liver parenchyma and non-tumorous surrounding tissue (figure 2B). In contrast, the ploidy spectrum in HCCs was altered with more mononuclear 4n and $\geq 8n$ populations (figure 2B). To complement our results, we analysed the distribution of mononuclear 2n, 4n and $\geq 8n$ hepatocytes in both tumour and non-tumour samples. We observed a clear bimodal distribution of these populations, with TT being enriched in mononuclear 4n and $\geq 8n$ populations (online supplementary figure S2B). Finally, we confirmed as observed in normal liver that there is no modification of nuclear ploidy spectra related to ageing in NTT and TT samples (online supplementary figure S1). In summary, our data

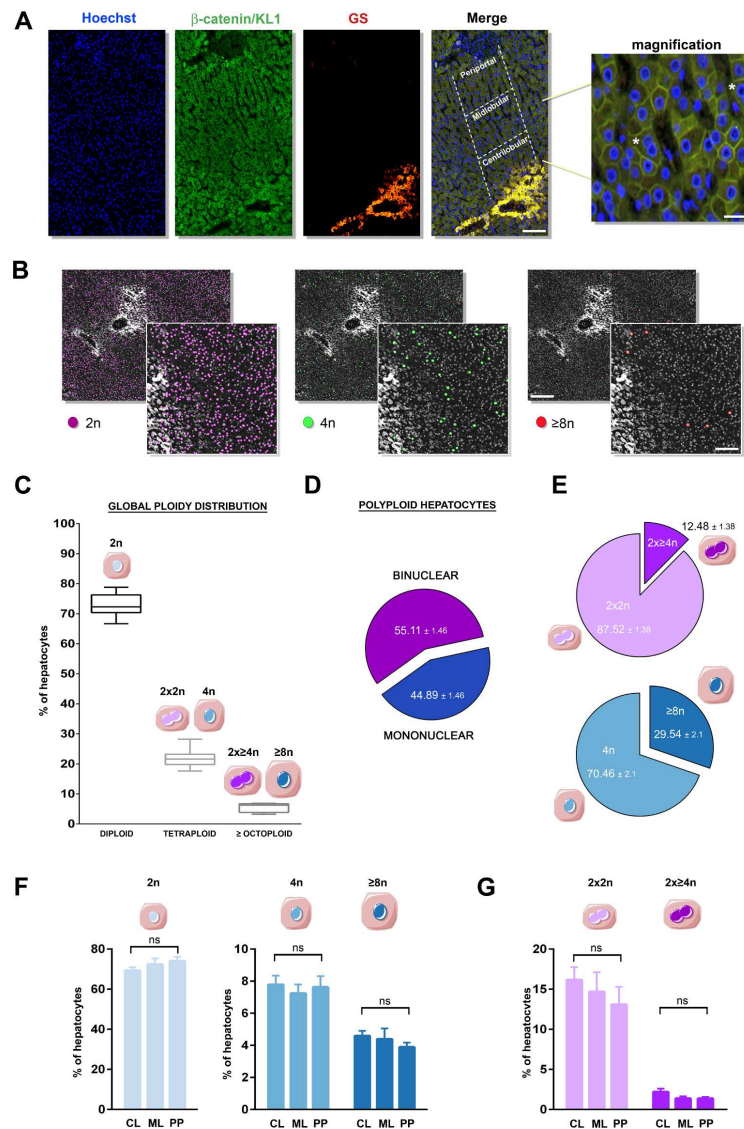


Figure 1 Cellular and nuclear ploidy: distribution and zonation in adult human liver lobule. (A) Images of human liver section immunostained with pan keratin/ β -catenin (plasma membrane labelling, green), glutamine synthetase (centrilobular zone labelling, red) and Hoechst (nucleus labelling, blue). Liver lobules were divided into three regions (periportal (PP), mid-lobular (ML), centrilobular (CL)) as indicated (merge image). Cellular and nuclear ploidy profiles were quantified in each zone (scale bar: 200 μ m). Magnification image highlights binuclear and mononuclear hepatocytes (* indicates binuclear hepatocytes) (scale bar: 40 μ m). (B) Images of a nuclear ploidy map: nuclei are artificially coloured according to their ploidy content: 2n/purple, 4n/green, \geq 8n/red. Centrilobular zones appear as white staining (scale bar: 40 μ m). Higher magnification images: scale bar=150 μ m. (C) Global ploidy (cellular and nuclear) distribution in adult livers (n=13): 2n hepatocytes, 4n hepatocytes (binuclear 2x2n and mononuclear 4n), \geq 8n hepatocytes (binuclear 2x \geq 4n and mononuclear \geq 8n). (D) Distribution of binuclear (purple: binuclear 2x2n and 2x \geq 4n) and mononuclear (blue: mononuclear 4n and \geq 8n) fractions in normal human livers (n=13). (E) Binuclear polyloid fraction (light purple: 2x2n, dark blue: 2x \geq 4n) and nuclear ploidy content in mononuclear fraction (light blue: 4n, dark blue: \geq 8n) in normal human livers (n=13). (F) Quantification of diploid hepatocytes according to human liver zonation (centrilobular [CL]/mid-lobular [ML]/periportal [PP] regions). (G) Quantification of mononuclear polyloid hepatocytes (4n, \geq 8n) and binuclear polyloid hepatocytes (2x2n, 2x \geq 4n) according to human liver zonation (CL, ML, PP regions). Data were compared using Kruskal-Wallis test. GS, glutamine synthetase; ns, not significant.

Table 1 Control patients

Variable		Total
Age (n=13) (years)	(mean, min-max)	57 (24–86)
Gender	Male:female	7 (53%):6 (46%)

Table 2 Clinical and molecular characteristics of patients

Variable	Total
Age (n=74) (years)	
(mean, min-max)	63 (27–83)
Gender	
Male:female	64 (86%):10 (14%)
Aetiology (including 12 patients with ≥ 2 aetiologies)	
Alcohol	20 (27%)
Hepatitis B	20 (27%)
Hepatitis C	20 (27%)
Haemochromatosis	7 (9%)
Metabolic syndrome	12 (16%)
Without known aetiology	6 (8%)
Tumour features (n=74)	
Tumour size (mm) (mean, min-max)	71 (11–190)
Macrovascular and/or microvascular invasion	39 (53%)
Edmondson grading (n=74)	
Edmondson I–II	30 (41%)
Edmondson III–IV	44 (59%)
Differentiation WHO (n=74)	
Good	13 (18%)
Medium	49 (66%)
Weak	12 (16%)
Non-tumorous liver: fibrosis according to METAVIR (n=73)	
F0–F1	20 (27%)
F2–F3	26 (36%)
F4	27 (37%)
GI66 classification (n=70)	
G1–G3	28 (40%)
G4–G5	42 (60%)
<i>TERT</i> mutations (n=72)	
Mutated	51 (71%)
Non-mutated	21 (29%)
<i>CTNNB1</i> mutations (n=71)	
Mutated	32 (45%)
Non-mutated	39 (55%)
<i>TP53</i> mutations (n=72)	
Mutated	23 (32%)
Non-mutated	49 (68%)
<i>ALBUMIN</i> mutations (n=64)	
Mutated	9 (14%)
Non-mutated	55 (86%)
<i>AXIN1</i> mutations (n=71)	
Mutated	4 (5.6%)
Non-mutated	67 (94.4%)
<i>ARID1A</i> mutations (n=71)	
Mutated	8 (11.3%)
Non-mutated	63 (88.7%)
<i>ARID2</i> mutations (n=71)	
Mutated	3 (4.2%)
Non-mutated	68 (95.8%)

support the concept that binuclear polyploid fraction is drastically reduced during human liver tumorigenesis, and, conversely, mononuclear polyploid fraction is specifically amplified in HCC tumours.

Alteration of nuclear ploidy spectrum is associated with specific histological and molecular features of HCC tumours

We looked deeper for correlations between nuclear ploidy spectrum and HCC features. First, we quantified the percentage of mononuclear polyploid hepatocytes (4n, $\geq 8n$) within HCC according to differentiation grade. We observed that hepatocytes were 15.2% mono 4n and 1.7% mono $\geq 8n$ in well-differentiated HCCs, 28.8% mono 4n and 3.7% mono $\geq 8n$ in moderately differentiated HCC, and 43.1% mono 4n and 7.8% mono $\geq 8n$ in poorly differentiated HCC (figure 3A). Thus, remarkably, amplification of nuclear ploidy is related to HCC histological grade. We performed additional analyses in order to define whether modification of nuclear ploidy spectrum could be related to aetiologies (HBV, HCV, alcohol, haemochromatosis, metabolic syndrome). We found a significant increase in mononuclear polyploid fractions (4n and $\geq 8n$) in HCC related to HBV infection (online supplementary figure S3). To go further, we defined whether modification of nuclear ploidy spectrum could be related to inflammatory infiltrates. We found a trend towards reduced diploid hepatocytes fraction and an increase in mononuclear polyploid hepatocytes in HCC with immune infiltrates (figure 3B). We finally identified whether amplification of nuclear ploidy could be assigned to a specific HCC genotype. Whole-exome sequencing has been performed on each HCC.^{25,26} The major mutations in HCC are *TERT* promoter ($\approx 56\%$), *CTNNB1* ($\approx 36\%$) and *TP53* ($\approx 33\%$).^{26,27} Other mutations as *ALBUMIN*, *AXIN 1*, *ARID1A* and *ARID2*, affecting less than 15% of HCCs, contribute also to development of HCC. Table 2 recapitulates the ratio of these mutations found in our cohort (table 2). We observed that nuclear ploidy spectrum is not significantly different between HCCs mutated (M) or non-mutated (NM) for *TERT* promoter and *CTNNB1*, respectively (figure 3C) but also for *ALBUMIN*, *AXIN 1* and *ARID1A* (online supplementary figure S4). For *ARID2*, we observed a slight reduction of nuclear polyploid fraction in mutated HCC (online supplementary figure S4). Notably, HCC mutated for *TP53* had a specific ploidy spectrum with amplification of mononuclear 4n and $\geq 8n$ populations and in correlation a decrease in diploid fraction (figure 3C). Multivariate analysis showed that *TP53* mutation accounted for a higher percentage of mononuclear polyploid hepatocytes when compared with both *TERT* and *CTNNB1* mutated tumours (online supplementary figure S5). These results revealed a difference in the spectrum of mononuclear polyploid distribution between patients with different histopathological and molecular features, and suggest that nuclear ploidy spectrum could be a useful parameter in redefining the HCC classification.

Highly polyploid HCC tumours are associated with bad prognosis and high proliferation rate

In other tissues, it has been demonstrated that polyploid tumour cells facilitate tumour progression, with these tumours being associated with higher rate of disease recurrence.²⁸ In order to determine whether the nuclear ploidy spectrum may have a prognostic value in HCC, we used the density distribution of the proportion of mononuclear polyploid hepatocytes (4n, $\geq 8n$) to define two groups of tumours: poorly polyploid (% polyploid hepatocytes $< 50\%$, n=49) and highly polyploid (% polyploid

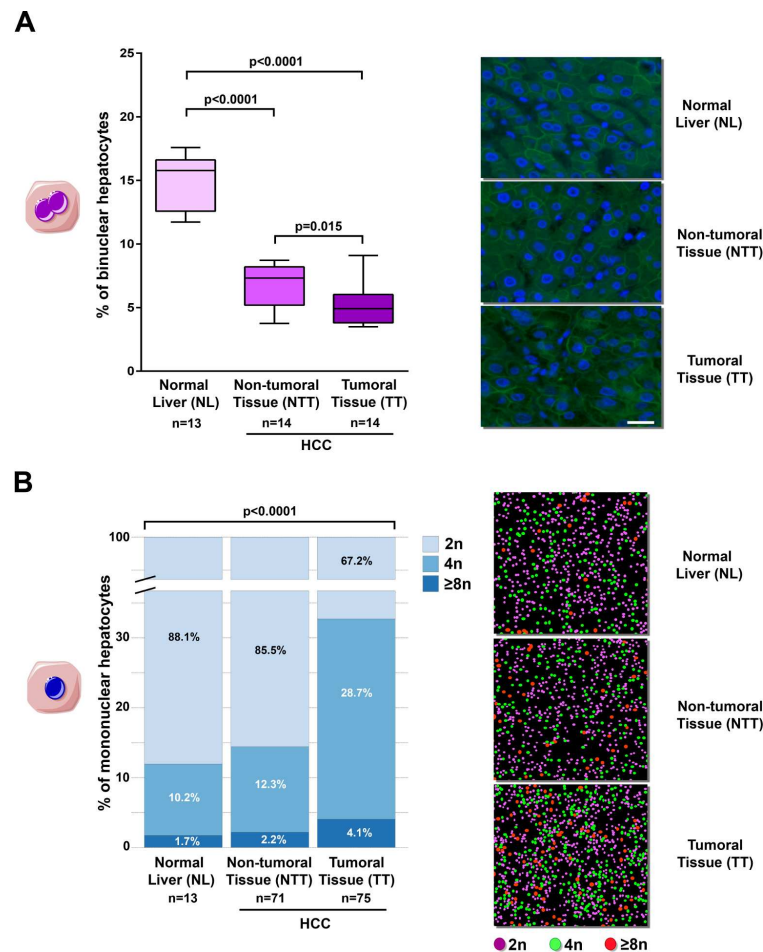


Figure 2 Cellular and nuclear ploidy spectra during human liver carcinogenesis. (A) Left panel: box plots for the percentage of binuclear hepatocytes ($2 \times 2n$ and $2 \times 4n$) relative to total hepatocytes population. The bottom, central and top lines of each box represent the first quartile, median and third quartile of the distribution, respectively ($n=13$ for normal liver [NL], $n=14$ for non-tumorous tissue [NTT] and HCC tumorous tissue [TT]). Values represent the mean \pm SEM. Data were compared using Kruskal-Wallis test. Right panel: representative magnification images (scale bar: 40 μ m) highlight binuclear and mononuclear hepatocytes in NL, NTT and HCC TT. (B) Left panel: percentage of mononuclear hepatocytes relative to total mononuclear hepatocytes in each group (NL, NTT and TT); n corresponds to the number of patients analysed. Data were compared using multivariate analysis of variance (MANOVA). Right panel: representative higher magnification images of nuclear ploidy spectrum (NL, NTT, TT). HCC, hepatocellular carcinoma.

hepatocytes $>50\%$, $n=20$) (figure 4A,B, online supplementary figure S6A). We observed that tumours with high polyploid content were significantly associated with a reduced 2-year and 5-year disease-free survival (DFS) ($p=0.01$ and $p=0.02$, respectively) compared with poorly polyploid tumours. These findings demonstrated the closed relationship between high DNA ploidy pattern and disease relapse in human liver (figure 4C). We next analysed an association with overall specific survival (OSS). These observations revealed only a trend towards full significance, probably due to the effectiveness of our cohort (online supplementary figure S6B). Correlation between nuclear ploidy

spectrum and tumour growth rate was also determined. For this purpose, we used Spearman rank correlation to test possible relationships between the nuclear ploidy content and the expression levels of five genes related to cellular proliferation (MKI67, PCNA, CDC20, BIRC5, AURKA) which were assessed by qPCR. These genes are either global markers of proliferation (MKI67, PCNA) or identified as overexpressed in HCCs (CDC20, BIRC5, AURKA).^{27–29} Interestingly, we found a negative correlation between the diploid cell contingent and the expression of these proliferation markers (figure 5A). In contrast, the proportion of mononuclear polyploid cells ($4n$, $\geq 8n$) was positively associated

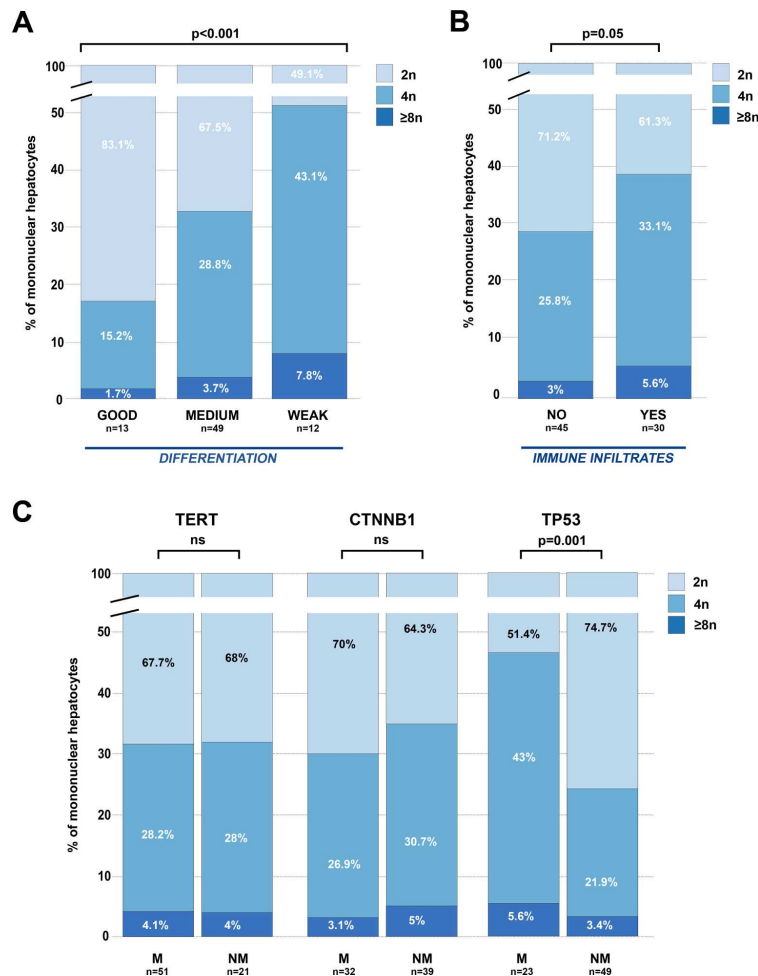


Figure 3 Alteration of nuclear ploidy spectrum related to histological and molecular features of hepatocellular carcinoma (HCC). (A, B) Comparison of the percentage of mononuclear diploid (2n), tetraploid (4n) and highly polyploid ($\geq 8n$) hepatocytes in HCC tumours according to tumour differentiation (A) (good n=13, medium n=49 and weak n=12), to the presence of inflammatory infiltrates (B) (no infiltrates n=45, infiltrates n=30). (C) Comparison of the percentage of mononuclear diploid (2n), tetraploid (4n) and highly polyploid ($\geq 8n$) hepatocytes in HCC tumours mutated (M) or non-mutated (NM) for *TERT* promoter, *CTNNB1* and *TP53*. n corresponds to the number of patients analysed. Data were compared using multivariate analysis of variance (MANOVA). ns, not significant.

with the expression of the five genes (figure 5A). Finally, in line with our previous observations demonstrating that nuclear ploidy is amplified in HCCs harbouring *TP53* mutation, we analysed whether there was a qualitative difference in the *TP53* mutations in poorly and highly polyploid tumours. Both groups showed mutations at the classical hotspot at the codon 249, characteristic of aflatoxin B1 exposure (online supplementary figure S7). Interestingly, we observed that highly polyploid tumours showed an enrichment of *TP53* mutations in the DNA-binding domain compared with poorly polyploid tumours (15/15 vs 4/7, p=0.02, Fisher's exact test) (online supplementary figure S7). Altogether, our results highlight a clear association between nuclear ploidy

spectrum and HCCs harbouring a low grade of differentiation, a high proliferation rate, *TP53* mutations and a poor prognosis (figure 5B). We propose that nuclear ploidy spectrum could be an additional accurate test for human HCC prognosis.

DISCUSSION

Although polyploidisation is a part of normal development in some tissues, alarmingly in others transient polyploidisation is known to occur in tumorigenesis giving rise to aneuploid cells.¹²⁶³⁰ A major challenge in this field is to understand whether the genesis of polyploid cells can be beneficial or detrimental

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2018-318021 on 12 April 2019. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on October 26, 2019 at Agence Bibliographique de l'Enseignement Supérieur (ABES). Protected by copyright.

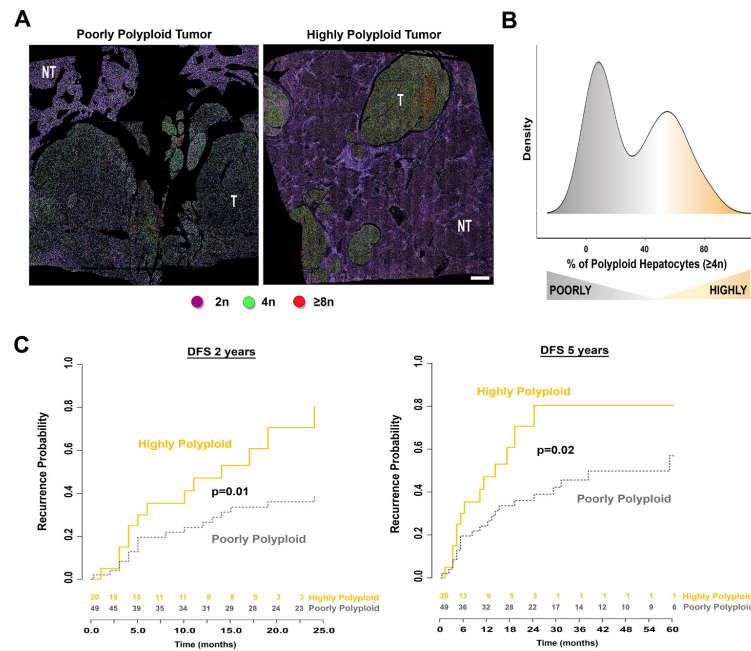


Figure 4 Patients with poorly or highly polyloid hepatocellular carcinoma (HCC) show a significant difference in disease-free survival. (A) Representative nuclear ploidy mapping of a poorly and a highly polyloid HCC (scale bar: 500 μ m). T indicates HCC tumours, NT non-tumorous surrounding tissue. Mononuclear hepatocytes are coloured according to their ploidy class: purple 2n, green 4n, red, $\geq 8n$. (B) Density plot represents the distribution of per cent of mononuclear polyloid hepatocytes ($\geq 4n$) in tumour tissue samples with the distinction of poorly polyloid HCCs (<50% of polyloid contingent) and highly polyloid HCCs (>50% of polyloid contingent). (C) Disease-free survival (DFS) probability (at 2 and 5 years) in patients with HCC tumours. Data were compared using Kaplan-Meier curves with log-rank test.

to specific tissues. Remarkably, the liver is a unique organ that modifies its ploidy content during normal homeostasis, regeneration and damage repair.^{2,5,15} We know that hepatocyte ploidy depends on the DNA content of each nucleus (nuclear ploidy) plus the number of nuclei per cell (cellular ploidy). Whether or not polyploidy is a risk factor or is protective in liver cancer is still under debate. Here, we developed an in situ imaging approach to determine whether cellular and nuclear ploidy content is altered during human liver tumorigenesis.

In agreement with previous studies,^{31–33} we first found that polyloid hepatocytes are the major components of human liver parenchyma although this population is presented in a reduced proportion compared with murine hepatic parenchyma (around 30% and 90%, respectively). In mice, it is well known that physiological hepatic polyplodisation takes place during postnatal growth when proliferating diploid hepatocytes fail to complete cytokinesis and produce binuclear tetraploid hepatocytes ($2 \times 2n$).^{10–12,34} If these hepatocytes proliferate again, they can undergo cytokinesis, leading to the genesis of mononuclear tetraploid hepatocytes (4n). This process can continue to generate octoploid and even higher polyloid hepatocytes. We observed that human polyloid hepatocytes are mainly binuclear and tetraploid ($2 \times 2n$). These data suggest that human liver parenchyma has a lower proliferation rate during postnatal growth compared with rodent liver parenchyma. Surprisingly, our results also showed that human polyloid hepatocytes have no specific parenchyma zonation. Recently, it was reported that,

in rodents, the spatial distribution of polyloid hepatocytes in the central vein (CV)-periportal vein (PV) axe correlates with metabolic zonation.^{21,22} This suggests that this specific zonation is not conserved in different mammalian species. However, further experiments are necessary to determine whether human hepatic polyploidy functions as a growth suppressor to restrict proliferation or metabolic adaptation, as it has only been demonstrated in rodent models.^{13,35}

It is important to note that, during postnatal development, hepatocytes undergo only cytokinesis failure to generate polyloid hepatocytes.^{10,12,34} Different studies have now clearly demonstrated that this specific cell cycle programme is physiologically induced to generate differentiated polyloid hepatocytes. We demonstrated that binuclear polyloid hepatocytes are barely present in human HCC strongly suggesting that cytokinesis defects are not present when malignant hepatocytes divide. The re-establishment of the cytokinesis programme is also observed in mice models, during liver regeneration after two-thirds partial hepatectomy.³⁶ Thus, at least in mice, loss of binuclearity is not necessarily associated with pathogenesis. Interestingly, recent studies reveal molecular links between cytokinesis machinery and proliferation of cancer cells.^{37,38} Thus, cytokinesis regulatory proteins such as Anillin (ANLN) and Rac GTPase activating protein 1 are commonly overexpressed in HCC.^{37,38} In this condition, malignant hepatocytes are less prone to generate binuclear polyloid hepatocytes. Interestingly and from a translational point of view, knockdown of at least

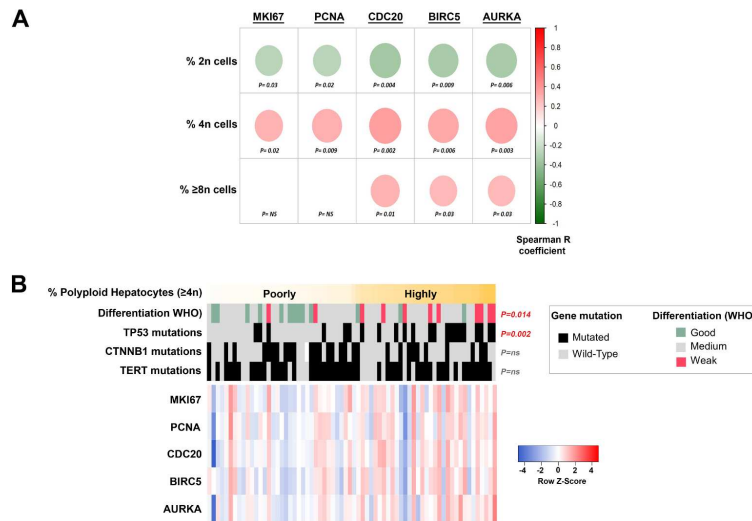


Figure 5 Highly polyploid hepatocellular carcinomas (HCC) are more proliferative than poorly polyploid HCCs. (A) Corplot showing Spearman's rank correlations between the proportion of mononuclear diploid (2n) or polyploid (4n, ≥8n) hepatocytes and the expression of five proliferation markers in 68 HCC samples. Red circles indicate significant positive correlations. Green circles indicate negative correlations. Colour intensities reflect the rho correlation coefficient. (B) Poorly and highly polyploid tumours have different histological and molecular characteristics of 68 HCC samples analysed by qPCR. Samples are sorted into columns according to their proportion of polyploid cells (≥4n). Upper panel shows the associations with gene mutations and tumour differentiation grade. Statistical analysis was performed using Fisher's exact tests and χ^2 test for gene mutations and differentiation, respectively. Bottom panel represents the heat map showing colour-coded gene expression levels of five proliferation markers. Upregulated and downregulated genes are represented in shades of red and blue, respectively.

ANLN in multiple HCC murine models was shown to reduce liver tumour development.^{37,38} Thus, we suggest that reduction of cellular ploidy could be a good marker of human premalignant liver parenchyma. Future work will unravel whether cytokinesis inhibition and re-establishment of cellular ploidy could be used as a preventive therapy for patients.³⁹

Finally, one of the major findings of our study is that nuclear ploidy spectrum is a marker of HCC aggressiveness. Interestingly, previous studies have described that HCCs were predominantly diploid.⁴⁰⁻⁴² Here, for the first time to our knowledge, we compared polyploid spectrum according to histological and molecular features of HCC tumours. We first uncovered that nuclear ploidy is sufficient to distinguish between premalignant and malignant liver parenchyma. Furthermore, we demonstrated that mononuclear polyploid hepatocytes are enriched in HCCs harbouring low grade of differentiation, higher proliferation rate and poor prognosis. Interestingly, in multiple cancer models, the polyploid state presented tumour-suppressive functions; acquiring multiple sets of chromosomes functioning to buffer against gene inactivating mutations.^{30,43,44} In this line, an elegant study by Zhu and collaborators demonstrated in HCC murine models that polyploid state may be a gatekeeper of liver tumorigenesis.⁴⁵ It is important to note that polyploidy protection was studied in a *TP53* wild-type background.⁴⁵ Of note, in different cancers, direct evidence of the oncogenic nature of polyploidy was demonstrated in a background of non-functional *TP53* tumour suppressor protein.^{1,4,46} We suggested that in human liver parenchyma, polyploidisation could be a driver of HCC development at least in a *TP53* mutated context.

In summary, in this study we underline the importance of quantification of cellular and nuclear ploidy spectra during human liver tumorigenesis. We propose that the amplification of mononuclear polyploid hepatocytes might be a marker of HCC with poor prognosis. Future studies will discover whether these new insights could provide more clues for therapeutic strategies.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Clinical data, biological and histological parameters

We retrospectively included 75 patients who underwent surgical resection for HCC at Henri Mondor University hospitals. Exclusion criteria were R1 or R2 resection, extrahepatic metastasis at the time of surgery, preoperative antitumorous treatment, unavailable histological slides or follow-up data, equivocal histological features suggestive of combined hepatocellular-cholangiocellular carcinoma and inadequate material for histological analysis (necrosis >90%). The following clinical and biological features were systematically recorded: age, gender, liver disease aetiology (infection by HBV or HCV, alcohol intake, metabolic syndrome, hereditary haemochromatosis or undetermined), Barcelona Clinic of Liver Cancer stage, preoperative alpha-fetoprotein serum levels and follow-up (early relapse and disease-specific survival). Two pathologists specialised in liver diseases and blinded to the clinical and molecular characteristics independently reviewed all samples. Cases with disagreement were analysed using a multipipe microscope, and a consensus was reached. The following histological features were systematically assessed: tumour differentiation (according

to Edmondson-Steiner grade), fibrosis stage (assessed with the METAVIR scoring system⁴⁷), macrovascular or microvascular invasion, tumour capsule and inflammatory infiltrates. The definitions of early, small and progressed, classic and poor prognosis HCC were based on the histological criteria for HCC proposed by the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Small and progressed HCC was defined by a distinctly nodular lesion with a diameter ≤ 2 cm and well-differentiated (G1) to moderately differentiated (G2) histological features, with malignancy recognised at first glance; no portal tracts were detectable. Poor prognosis HCC was defined as HCC case displaying recurrence within 2 years. Classic HCC was defined as non-early, non-small, non-poor prognosis HCC. For genetic features, we extracted data from our former whole-exome sequencing study and selected genes mutated (*TERT* promoter, *TP53*, *CTNNB1*, *ALBUMIN*, *AXIN1*, *ARID1A*, *ARID2*).²⁶ Control patients (n=13) underwent liver resection for benign tumours. All patients gave their written informed consent in accordance with French legislation.

Immunofluorescence

Liver sections (5 μ m) were deparaffinised and incubated in citrate buffer at 95°C for 20 min for antigen retrieval. Sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies including anti- β -catenin (1:200 dilution, BD Biosciences, 610154), anti-pan keratin C11 antibody (1:200 dilution, Cell Signaling, 4545) and GS antibody (1:200 dilution, BD Biosciences, 610518). Anti-mouse or anti-rabbit IgG antibodies (1:500) conjugated with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher) were used as secondary antibodies. Hoechst 33342 (0.2 μ g/mL) purchased from Sigma-Aldrich was included in the final wash to counterstain nuclei. All images were collected with the slide imager NanoZoomer 2.0-HT (Hamamatsu).

Quantification of cellular and nuclear ploidy profiles in human liver sections

For nuclear ploidy, we developed a method implemented from ImageJ (Rasband, WS, ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2016) to infer ploidy from Hoechst staining.

Ploidy classification was based on the diameter of the hepatocyte nuclei. Nuclei were stained by Hoechst and automatically detected and their area (pixel²) was assessed as previously described.^{18,20,21} First, we extracted the area of each nucleus and fit a Gaussian mixture model to the distribution of nuclear diameters. We selected nuclei according to their nuclear circularity (≥ 0.7). Nuclei of non-epithelial cells present a lower circularity. Second, we designed thresholds to separate the different populations, located between areas of 30–60 pixel², 65–90 pixel² and 95–500 pixel² to separate the 2n, 4n and $\geq 8n$ nuclei, respectively. Nuclei with an estimated area < 30 pixel² or > 500 pixel² were excluded (neither non-hepatocytes population nor incorrect Hoechst segmentation). Each region of interest is assigned to a specific colour: 2n nuclei/purple, 4n/green and $\geq 8n$ /red. For each patient, around 500 000 nuclei were analysed.

For cellular ploidy, mononuclear and binuclear fractions were quantified on 10 random high-power fields (about 5000 cells) on scans of stained liver sections.

Quantitative RT-PCR

We assessed mRNA expression levels in 68 HCCs and five normal liver tissue samples. Total RNA from frozen surgical samples was extracted using Maxwell 16 LEV simplyRNA Tissue

Kit (Promega). Reverse transcription of 500 ng of total RNA was performed using the High-Capacity Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Then, expression levels of five proliferation markers were assessed using specific TaqMan predesigned assays (Hs01032443_m1, Hs00696863_g1, Hs00415851_g1, Hs00153353_m1, Hs01582073_m1; Thermo Fisher Scientific) on Fluidigm 96 Dynamic Arrays with the BioMark Real-Time PCR System. The relative amount of RNA was calculated with the $\Delta\Delta$ CT method using 18S ribosomal RNA and the expression level of the corresponding gene in five normal liver samples.

Statistics

Statistical analysis and data visualisation were performed using R software V.3.3.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <https://www.R-project.org>) and Bioconductor packages. Continuous variables were compared using non-parametric Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test to compare two groups and more than two groups, respectively. Analysis of multivariate data was performed using a multivariate analysis of variance with semiparametric designs in order to avoid the assumptions of multivariate normality and covariance homogeneity. Correlation analysis between continuous data was performed using Spearman's rank-order correlation. Qualitative data were compared using the Fisher's exact test to compare two groups and χ^2 test to compare more than two groups. Univariate survival analysis was performed using Kaplan-Meier curves with log-rank statistics to assess the difference in 2-year and 5-year DFS and overall survival (OSS) in two groups. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Author affiliations

¹Team Proliferation Stress and Liver Physiopathology, Genome and Cancer, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Paris, France

²Team Functional Genomics of Solid Tumors, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Université Paris 13, Labex Immuno-Oncology, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Paris, France

³INSERM U1162, Paris, France

⁴Department of Pathology, Hôpital Henri Mondor, Creteil, France

⁵Stress and Cancer Laboratory, Equipe Labellisée LNCC, Institut Curie, Paris, France

⁶INSERM U830, Paris, France

⁷Cancer Metabolism and Signaling Networks Program, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, California, USA

⁸INSERM, UMRS 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris 06, Paris, France

⁹Institut Cochin, Paris, France

¹⁰Department of Pathology, Beaujon Hospital, Clichy, France

¹¹Hôpital Beaujon, Clichy, France

Acknowledgements We thank the Tumor Biobank of Henri Mondor University Hospital and the Réseau National Centre de Ressources Biologiques (CRB) Foie for contributing to the tissue collection. We also thank the facilities of Cochin Institute (Histology, Immunostaining, Laser Microdissection [HistIM], Imaging Facility of Necker Institute and Imaging Photonic [IMAG'IC]) and CHIC (Center of Histology Imaging and Cytometry) facility of the Centre de Recherche des Cordeliers. Finally, we thank Benedict E Monteiro for the English language editing of this manuscript.

Contributors MBN designed, performed and analysed the experiments, compiled the figures and wrote the manuscript. SC analysed the experiments, compiled the data with statistical analysis /designed the figures and wrote the manuscript. JC designed and analysed the experiments, and compiled the data. RD, GG, CM, LA, TG, CK, MA and GC performed experimental research. VP and JPC analysed the data and provided critical help on the manuscript. SCM analysed the data, designed the figures and provided critical help on the manuscript. JZR analysed the experiments, funded the project and provided critical help on the manuscript. CD designed and performed the experiments, analysed the data, funded the project and wrote the manuscript.

Funding This study was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Institut National du Cancer (PRTK-2017, PLBIO 2018-140), Fondation ARC (Association de Recherche sur le Cancer), Ligue

Centre le Cancer (Comité de Paris), the Cancéropôle Ile-de-France (Emergence 2015), The Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF-SUBV 2017), EVA-Plan Cancer INSERM HTE and the Agence Nationale de Recherche ANR (ANR-16-CE14).

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Obtained.

Ethics approval The study was approved by the Institutional Review Board committees (CCPRB Paris Saint Louis, 1997, 2004 and 2010)

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

REFERENCES

- Davoli T, de Lange T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:585–610.
- Genric G, Desdouets C. Polyploidization in liver tissue. *Am J Pathol* 2014;184:322–31.
- Fox DT, Duronio RJ. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development* 2013;140:3–12.
- Ganem NJ, Storchova Z, Tetraploidy PD. Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:157–62.
- Genric G, Celton-Morizur S, Desdouets C. Polyploidy and liver proliferation. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36:29–34.
- Pandit SK, Westendorp B, de Bruijn A. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends Cell Biol* 2013;23:556–66.
- Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, et al. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 2005;437:1043–7.
- Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, et al. Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017;376:2109–21.
- Zack TI, Schumacher SE, Carter SL, et al. Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nat Genet* 2013;45:1134–40.
- Guidotti JE, Brégerie O, Robert A, et al. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:19095–101.
- Celton-Morizur S, Merlen G, Couton D, et al. The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. *J Clin Invest* 2009;119:1880–7.
- Margall-Ducos G, Celton-Morizur S, Couton D, et al. Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. *J Cell Sci* 2007;120:3633–9.
- Wilkinson PD, Delgado ER, Alencastro F, et al. The Polyploid State Restricts Hepatocyte Proliferation and Liver Regeneration in Mice. *Hepatology* 2019;69.
- Celton-Morizur S, Desdouets C. Polyploidization of liver cells. *Adv Exp Med Biol* 2010;676:123–35.
- Duncan AW. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Semin Cell Dev Biol* 2013;24:347–56.
- Gupta S. Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin Cancer Biol* 2000;10:161–71.
- Genric G, Desdouets C. Liver polyploidy: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Oncotarget* 2015;6:8430–1.
- Genric G, Mailet V, Paradis V, et al. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2015;125:981–92.
- Forner A, Llovet JM, Bruix J. Chemoembolization for intermediate HCC: is there proof of survival benefit? *J Hepatol* 2012;56:984–6.
- Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, et al. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Current Biology* 2012;22:1166–75.
- Tanami S, Ben-Moshe S, Elkayam A, et al. Dynamic zonation of liver polyploidy. *Cell Tissue Res* 2017;368:405–10.
- Morales-Navarrete H, Segovia-Miranda F, Klukowski P, et al. A versatile pipeline for the multi-scale digital reconstruction and quantitative analysis of 3D tissue architecture. *Elife* 2015;4.
- Benhamouche S, Decaens T, Godard C, et al. Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Dev Cell* 2006;10:759–70.
- Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* 1992;53:275–354.
- Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J Hepatol* 2017;67:727–38.
- Schulze K, Imbeaud S, Letouze E, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet* 2015;47:505–11.
- Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, et al. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2015;149:1226–39.
- Coward J, Harding A. Size does matter: why polyploid tumor cells are critical drug targets in the war on cancer. *Front Oncol* 2014;4:123.
- Reboussou S, La Bella T, Reik S, et al. Proliferation markers are associated with met expression in hepatocellular carcinoma and predict vandetanib sensitivity *In Vitro*. *Clin Cancer Res* 2017;23:4364–75.
- Storchova Z, Pellman D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:45–54.
- Kudryavtsev BN, Kudryavtseva MV, Sakuta GA, et al. Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1993;64:387–93.
- Saeter G, Lee CZ, Schwarze PE, et al. Changes in ploidy distributions in human liver carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:1480–4.
- Toyoda H, Bregerie O, Vallet A, et al. Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis. *Gut* 2005;54:297–302.
- Hsu SH, Delgado ER, Otero PA, et al. MicroRNA-122 regulates polyploidization in the murine liver. *Hepatology* 2016;64:599–615.
- Miettinen TP, Pessa HK, Caldez MJ, et al. Identification of transcriptional and metabolic programs related to mammalian cell size. *Curr Biol* 2014;24:598–608.
- Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, et al. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Biol* 2012;22:1166–75.
- Yang XM, Cao XY, He P, et al. Overexpression of Rac GTPase Activating Protein 1 contributes to proliferation of cancer cells by reducing hippo signaling to promote cytokinesis. *Gastroenterology* 2018;155:1233–1249.
- Zhang S, Nguyen LH, Zhou K, et al. Knockdown of anillin actin binding protein blocks cytokinesis in hepatocytes and reduces liver tumor development in mice without affecting regeneration. *Gastroenterology* 2018;154:1421–34.
- Desdouets C, Avila MA. Inhibiting cytokinesis in the liver: a new way to reduce tumor development. *Gastroenterology* 2018;154:1229–31.
- Anti M, Marra G, Rapaccini GL, et al. DNA ploidy pattern in human chronic liver diseases and hepatic nodular lesions. Flow cytometric analysis on echo-guided needle liver biopsy. *Cancer* 1994;73:281–8.
- Nagasue N, Kohno H, Hayashi T, et al. Lack of intratumoral heterogeneity in DNA ploidy pattern of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1993;105:1449–54.
- Saeter G, Schwarze PE, Nesland JM, et al. Diploid nature of hepatocellular tumours developing from transplanted preneoplastic liver cells. *Br J Cancer* 1989;59:198–205.
- Davoli T, de Lange T. Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. *Cancer Cell* 2012;21:765–76.
- Otto SP. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 2007;131:452–62.
- Zhang S, Zhou K, Luo X, et al. The polyploid state plays a tumor-suppressive role in the liver. *Dev Cell* 2018;47:390.
- Aylon Y. p53: guardian of ploidy. *Mol Oncol* 2011;5:315–23.
- Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289–93.

DISCUSSION

La stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD) est une pathologie multifactorielle complexe qui n'est pas encore tout à fait comprise. La stéatose peut évoluer vers une étape inflammatoire accompagnée de différents stress au niveau des organelles, que l'on appelle stéatohépatite (NASH). Lors de cette séquence on retrouve une accumulation de dommages de l'ADN qui permet l'émergence d'un carcinome hépatocellulaire (CHC). A partir de modèles murins soumis à des régimes alimentaires (*High-Fat High-Sucrose* et *Choline-Deficient High-Fat Diet*), qui permettent d'étudier l'initiation et le développement de la NAFLD, mes travaux de thèse montrent que la division de l'hépatocyte stéatosique est altérée et est associée à une diminution de la vitesse des fourches de réplication entraînant un stress de réplication. Ce stress provoque la formation de lésions de l'ADN (γ -H2AX) ce qui induit l'activation de la voie de réponse aux dommages de l'ADN (DDR) sous la signalisation ATR/CHK1/RPA. De façon surprenante, ce sont des reprogrammations métaboliques induisant une dérégulation du pool de nucléotides cellulaires qui sont à l'origine de la genèse du stress de réplication. Finalement, ces cellules endommagées sont capables d'activer la voie senseur d'ADN cGAS-STING conduisant à une réponse inflammatoire interférons de type I. Mes travaux de thèse apportent ainsi un éclairage nouveau sur l'origine de la genèse de cellules endommagées durant la stéatose hépatique et la progression vers le stade de NASH.

1 Différences d'activation du DDR dans les deux modèles murins NAFLD

Dans le foie sain, la majorité des cellules et notamment les hépatocytes sont dans un stade de quiescence (phase G0 du cycle cellulaire) avec un turn-over très faible. La durée de vie d'un hépatocyte est d'environ 200 jours. Dans le cadre de maladies chroniques du foie (CLD), des études ont montré que la mort cellulaire, par l'apoptose et la nécroptose, provoque la prolifération d'hépatocytes adjacents afin de maintenir la masse hépatique (Luedde et al., 2014). C'est ce qu'on appelle la prolifération compensatoire (Maeda et al., 2005). Lors d'agressions aiguës, le foie est capable de retrouver sa masse en une dizaine de jours alors que dans les CLD les stimuli sont présents de façon chronique ce qui provoque une dérégulation du processus (Schwabe and Luedde, 2018). La mort cellulaire conduit à la libération de DAMPs capables d'activer le système immunitaire et les cellules voisines via les PRRs (Kaczmarek et al., 2013). La mort cellulaire est un acteur clé de la carcinogenèse hépatique. Notamment, le niveau circulant des aminotransférases (marqueur de la mort hépatocytaire) est un marqueur prédictif

du développement de cancer du foie ([Ratziu et al., 2012](#)). De nombreuses études ont également montré la présence de dommages de l'ADN dans la NAFLD. La présence d'ADN endommagé par une forme oxydée (8-OHdG) ou comportant des adduits (ϵ Ad) sont des marqueurs prédictifs de l'évolution de la pathologie chez l'Homme ([Seki et al., 2002](#); [Tanaka et al., 2013](#); [Teufel et al., 2015](#)). Cette relation unique entre mort cellulaire, accumulation de dommages, inflammation chronique et cancer n'est pas rencontrée dans les autres organes et se produit lors la NAFLD. Bien que la NAFLD soit associée à une capacité de prolifération réduite des hépatocytes, notamment par la présence d'hépatocytes sénescents (activation de p21 et p16) ayant des télomères courts et endommagés, il a été montré que certains d'entre eux gardent une capacité de prolifération et promeuvent la tumorigenèse. Par exemple, l'équipe de Michael Karin montre dans un modèle murin de NASH (MUP-uPA + HFD) que le stress du RE coopère avec la surnutrition pour induire le développement de CHC de façon TNF-dépendante. L'équipe démontre que le stress oxydant est un élément clé induisant les dommages hépatiques et la mort cellulaire, ce qui entraîne une prolifération compensatoire des hépatocytes par la libération de TNF et par l'action de cellules immunitaires ([Nakagawa et al., 2014b](#)). Plus récemment, l'équipe d'Achim Weber a apporté des informations complémentaires quant à cette prolifération compensatoire dans les CLD, à partir du modèle murin Mcl-1^{KO}. Dans ce modèle particulier, l'une des principales protéines anti-apoptotiques hépatiques, MCL-1, est supprimée, ce qui compromet sévèrement l'homéostasie hépatique ([Hikita et al., 2009](#); [Vick et al., 2009](#)). A un an de vie, 50% des souris ont des tumeurs hépatiques présentant des aberrations chromosomiques ([Weber et al., 2010](#)). Son équipe montre que les souris Mcl-1^{KO} âgées de deux mois de vie exhibent une prolifération compensatoire associée à l'apoptose et la présence de dommages de l'ADN ([Boege et al., 2017](#)). De façon intéressante, un tiers des cellules dans le cycle cellulaire (Ki67+) expriment le marqueur de lésions à l'ADN γ -H2AX, ce qui laisse suggérer la présence d'un stress de réplication. De plus, les auteurs montrent que ces souris présentent une instabilité des sites fragiles, tout comme les patients atteints de CLD. Ceux-ci ont également une forte expression des gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN.

Comme il a été développé, la prolifération compensatoire dans la NAFLD se produit à bas bruit dans le parenchyme hépatique et ne permet pas une étude approfondie. Afin d'analyser plus finement l'ensemble des mécanismes se produisant lors de cette prolifération particulière nous avons utilisé un modèle d'étude particulier : la culture primaire d'hépatocytes

murins. Ainsi, la culture primaire nous permet d'augmenter très significativement le nombre d'hépatocytes en phase S, par une synchronisation de ces derniers dans le cycle cellulaire à l'aide d'EGF, et d'étudier à large échelle les différents mécanismes moléculaires et cellulaires qui interviennent lors de leur réplication. Mes travaux de thèse apportent les éléments nécessaires permettant de confirmer que l'accumulation de dommages de l'ADN peut être attribuée à la présence d'un stress de réplication dans la NAFLD. A l'aide de la technique du peignage moléculaire, nous démontrons des altérations de la réplication, associées à la diminution de la vitesse de réplication. La réplication de l'ADN est un processus vulnérable. Le stress de réplication est une source majeure d'instabilité génomique et, une caractéristique des cellules précancéreuses et cancéreuses. Ce stress peut provoquer des mutations, des cassures ainsi que des réarrangements chromosomiques (Gaillard et al., 2015). Mes travaux démontrent que le stress de réplication dans la NAFLD est responsable de la genèse de cassures de l'ADN, qui dépendent fortement de l'état d'activation de la protéine ATR. En effet, les hépatocytes HFHS présentent une forte activation de la voie ATR (CHK1/RPA) associée à une forte diminution de la vitesse de réplication (0,70 Kb/min vs 1,05Kb/min pour les hépatocytes SD). Les hépatocytes CDHFD montrent une légère activation de la voie du DDR et une vitesse de réplication plus rapide que les hépatocytes HFHS (0,95 Kb/min). Ces résultats mettent en évidence que la diminution de la vitesse de réplication corrèle avec l'activation de la protéine ATR. Plus la voie du DDR sera activée, plus la réplication sera lente.

En comparaison avec les hépatocytes HFHS, nous avons observé que les hépatocytes CDHFD présentent plus de cassures de l'ADN par le test du COMET, et, la présence de cassures double-brin, analysée par le marqueur 53BP1. Ainsi, nous pouvons suggérer que la diminution de la vitesse de réplication permet d'éviter la formation de lésions à fort potentiel d'instabilité chromosomique. Dans le modèle CDHFD, la vitesse de réplication n'est pas drastiquement réduite, ce qui entraîne des cassures double-brin de l'ADN (Figure 42A).

Cette hypothèse est appuyée par une étude qui démontre que la diminution de la vitesse de réplication induite par la protéine ATR permet d'assurer la réparation des lésions (Mutreja et al., 2018). Ces résultats sont également cohérents avec une étude du groupe de Patrick Revy, qui montre chez un patient muté de façon hétérozygote pour le gène *ATR* (syndrome de Seckel) des perturbations de la réplication associée à des cassures de l'ADN (Mokrani-Benhelli et al., 2013). La mise en culture de fibroblastes issus de ce patient met en évidence la présence de cassures double-brin de l'ADN associée à l'activation d'ATM. Les

auteurs suggèrent que l'activation d'ATR permet de restreindre les effets délétères de la perte de fonction d'ATR, et agit comme un rempart contre la tumorigenèse (Mokrani-Benhelli et al., 2013).

Afin d'étudier de façon plus approfondie le rôle de la protéine ATR dans la NAFLD, j'ai effectué des analyses complémentaires visant à supprimer l'expression de cette protéine dans le compartiment hépatocytaire au stade *in vivo*, par une approche CRISPR/Cas9/AAV8. Les souris étaient infectées par un AAV8 contenant le produit de mutagenèse à quatre semaines de vie (foie mature), puis mise sous régime pendant 6 mois (Figure 42B & C). De façon intéressante, les hépatocytes HFHS mutés synchronisés dans le cycle cellulaire, montrent bien la présence de cassures double-brin de l'ADN, lors de la réplication (Figure 42D). Tout comme l'étude du groupe de Patrick Revy, ces hépatocytes fortement endommagés présentent bien une activation de la signalisation des cassures double-brin, caractérisée par la phosphorylation d'ATM^{S1981} et de RPA32^{S4-8} (Figure 42E). Ce résultat permet de confirmer que la rupture de la signalisation ATR, lorsque les hépatocytes stéatosiques présentent un stress de réplication, conduit bien à la présence de cassures double-brin. En conséquence, nous pouvons suggérer que la signalisation du DDR (ATR et ATM) dans l'hépatocyte stéatosique CDHFD n'est que peu active.

La présence de cassures de l'ADN dans les hépatocytes stéatosiques en division nous permet de suggérer que certains réarrangements chromosomiques peuvent survenir. Il serait intéressant d'analyser leurs présences en fin de culture ainsi que sur du tissu hépatique. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que le modèle CDHFD est décrit comme étant un modèle de transition NASH-CHC (Wolf et al., 2014). Il a notamment été rapporté la présence de nombreux réarrangements chromosomiques dans le sous-groupe de CHC caractérisé par l'activation de la cycline A2 et E2, qui présente un stress de réplication associé à une forte activité d'ATR (Bayard et al., 2018). Ces réarrangements sont fortement enrichis dans les régions répliquées précocement, suggérant un lien direct entre stress de réplication et réarrangements chromosomiques. Ce sous-groupe représente 7% des CHC sur les données analysées et est majoritairement induit par la présence d'insertions d'ADN viral (hépatite B et AAV2). Cependant, ce sous-groupe peut représenter jusqu'à 14% des CHC qui se développent sur tissu non-cirrhotique. Au regard du développement des CHC dans les NAFLD, qui peuvent également émerger sur des foies non-cirrhotiques (Friedman et al., 2018b), ce type de mécanisme pourrait peut-être avoir lieu dans certains sous-groupes.

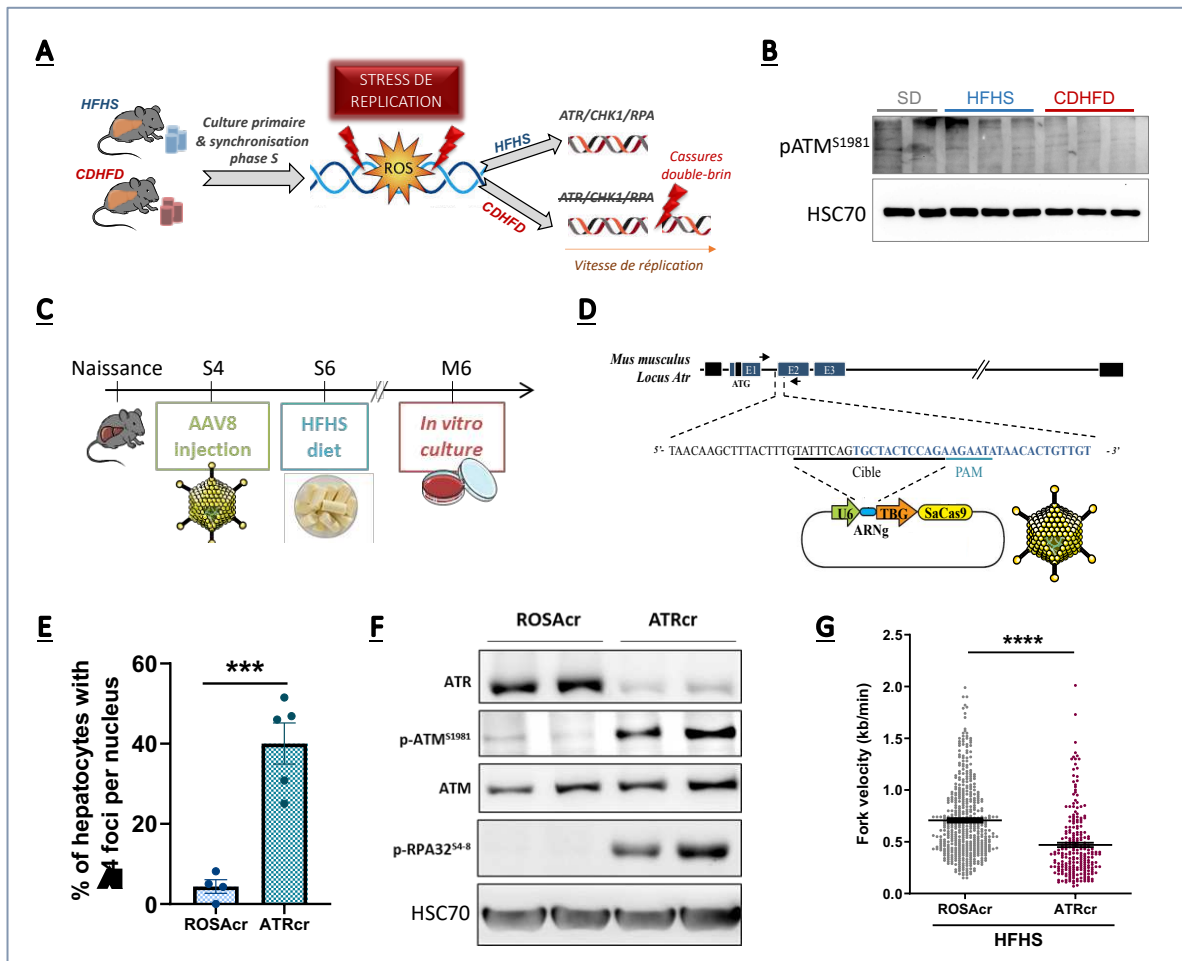


FIGURE 42. LA PERTE DE LA SIGNALISATION ATR LORS DE LA DIVISION DE L'HEPATOCYTE STEATOSIQUE PROVOQUE LA GENESE DE CASSURES DOUBLE-BRIN ET L'ACTIVATION D'ATM

A. Représentation schématique du stress de répliation dans les hépatocytes HFHS et CDHFD. **B.** Représentation schématique de l'expérience. Des souris C57Bl6/J sont infectées par un AAV8 porteur de la construction CRISPR/Cas9 à 4 semaines de vie (S4). A 6 semaines (S6), les souris sont mises sous régime HFHS. L'analyse s'effectue 6 mois (M6) après la mise sous régime. **C.** Outil CRISPR/Cas9/AAV8 basé sur l'étude de (Ran et al., 2015). Ce système est constitué (1) d'un « ARN guide » (ARNg) ciblant la séquence d'ADN du gène *Atr* (début de l'exon 2) et (2) d'une endonucléase, la Cas9 de *Staphylococcus aureus*. Ce plasmide est porté par un adéno-associé virus de sérotype 8 (AAV8), qui possède un tropisme pour les hépatocytes. Le gène *Cas9* est également sous contrôle d'un promoteur hépatospécifique, le thyroxine-binding globuline (TBG). Ce type de construction permet de cibler un gène hépatocytaire à n'importe quel moment de la vie de la souris. Le contrôle de mutagenèse est un ARN guide ciblant le promoteur Rosa26, utilisé comme référence lors de mutagenèses dirigées puisqu'il ne code aucune protéine. **D.** Quantification de la distribution des foci 53BP1 (<4 et ≥4) dans les hépatocytes HFHS mutés ou non pour le gène *Atr*. T-test ***P < 0.001. **E.** Western-blot ATR, pATM^{S1981}, ATM, pRPA32^{S4-8} et HSC70 à 60h de culture. ATR sert de marqueur de mutagenèse. pATM^{S1981} et pRPA^{S4-8} sont des marqueurs d'activation suite à la présence de cassures double-brin de l'ADN.

2 Quelles sont les causes de la diminution du pool de dNTPs dans l'hépatocyte stéatosique ?

Les causes d'un stress de réplication sont multiples. D'un point de vue endogène, il peut être induit par quatre facteurs différents: **(1)** une initiation inadéquate des origines de réplication, **(2)** des obstacles avec les fourches de réplication, **(3)** un conflit entre les machineries de transcription et de réplication, ou **(4)** une déplétion du pool de nucléotides (Magdalou et al., 2014).

Les pools intracellulaires de dNTPs doivent être finement régulés lors de la réplication afin de maintenir une stabilité génomique. Chez la levure, une diminution de ce pool provoque une diminution de la vitesse de réplication et un stress de réplication (Poli et al., 2012). De plus, la déstabilisation du pool de nucléotides promeut la tumorigenèse dans des cellules humaines. En effet, l'ajout exogène de nucléosides à des cellules, effectuant un stress de réplication induit par un oncogène, réduit l'accumulation de dommages de l'ADN et permet de prévenir sa transformation. La dérégulation du pool de pyrimidine est également un facteur favorisant l'instabilité génétique et la transformation. La déficience dans l'une des enzymes de biosynthèse (thymidine kinase, dTMP synthase, dCTP kinase, CTP synthase et dCMP deaminase) induit des dommages de l'ADN, des mutations et augmente le taux de recombinaison homologue (Meuth, 1989). La suppression de l'hélicase BLM, mimant un syndrome de Bloom, dans des cellules HeLa est responsable de la perte d'expression de la cytidine deaminase, entraînant *de facto* une diminution du pool de pyrimidines, un stress de réplication et des réarrangements chromosomiques (Chabosseau et al., 2011). Dans ce sens, mes travaux de thèse montrent que l'hépatocyte stéatosique (HFHS et CDHFD) en division présente un déséquilibre des pools de dNTPs responsable du stress de réplication. L'ajout exogène de dATP, dGTP, dCTP et thymidine permet de diminuer les dommages de l'ADN, la présence des cassures et l'activation du DDR. De façon intéressante, seuls le dATP et le dTTP présentent un déséquilibre alors que des différences dans l'ensemble des nucléotides mono- et di-phosphate (NMPs/NDPs) sont retrouvées.

L'enzyme RNR (ribonucléotide réductase) capable de convertir les NDPs en dNDPs est l'enzyme limitante dans la production des dNTPs (Figure 25) (Zhao et al., 1998). Il s'agit d'un complexe protéique contenant deux copies de la sous-unité catalytique R1 (RRM1) et deux copies de la sous-unité régulatrice R2 (au choix entre RRM2 et RRM2b) (Mathews, 2015). Sa

surexpression ou son inhibition chez la levure permet de réguler le pool de dNTPs (Sanvisens et al., 2013). Bien que la sous-unité R1 soit exprimée de façon constitutive, la sous-unité R2 (RRM2) est régulée de façon cyclique lors du cycle cellulaire avec un pic lors de la phase S (Engström and Rozell, 1988). C'est en fait ATR qui régule cette sous-unité M2, de façon E2F1-dépendant, même en l'absence de dommages de l'ADN (Buisson et al., 2015). ATR maintient également un niveau important de RRM2 lors de lésions de l'ADN en phase S en inhibant la M-CDK et la cycline F qui dégradent normalement RRM2 en fin de phase G2 (D'Angiolella et al., 2012). Ainsi, lors de la réplication des hépatocytes stéatosiques, nous pourrions émettre l'hypothèse que la sous-unité RRM2 n'est pas correctement exprimée ou activée, entraînant *de facto* une diminution rapide du pool de dNTPs. Toutefois, par analyse de l'expression des messagers RRM2 et RRM2b, nous montrons une forte augmentation de l'expression de RRM2b à 60h de culture dans les hépatocytes stéatosiques (Figure 43A). Afin de montrer que la protéine n'est pas déficiente, il serait également intéressant de regarder son expression au niveau protéique ainsi que son activité (Jong et al., 1998). De plus, il a été montré que l'abondance de glucose dans des cellules pancréatiques entraîne une dérégulation du pool de dNTPs par une modification post-traductionnelle, une O-GlcNAcylation (addition de N-Acétyleglucosamine sur les résidus de sérines ou thréonine des protéines), de RNR qui inhibe son activité (Hu et al., 2019). Ainsi, dans notre étude il serait également intéressant de regarder la présence de modifications post-traductionnelles sur RNR, pouvant résulter du métabolisme des sucres ou des lipides capables d'inhiber son activité. La diminution du pool de dATP est généralement induite par une perte de fonctionnalité de la RNR. L'ajout d'hydroxyurée (HU), inhibiteur spécifique de RNR, induit une diminution spécifique de dATP mais pas des autres dNTPs (Wilhelm et al., 2016). Le traitement d'hépatocytes contrôles par du HU provoque bien une diminution spécifique du pool de d'ATP (Figure 43B). Cependant, ces résultats n'expliquent pas la diminution du pool de dTTP dans les hépatocytes stéatosiques. Nous pourrions ainsi analyser l'expression des enzymes de la biosynthèse des nucléotides ainsi que des protéines pouvant jouer sur la régulation du pool de dNTPs. Par exemple, l'augmentation transcriptionnelle des gènes de la biosynthèse des nucléotides peut être induite par c-MYC afin d'augmenter le pool de dNTPs et d'éviter un stress de réplication (Bester et al., 2011). Également, l'activation de la dNTPase SAMHD1 pourrait réduire le pool de dNTPs (Goldstone et al., 2011). Bien que cette protéine soit activée en réponse à une infection virale, la présence d'ADN cytosolique lors de la division de l'hépatocyte stéatosique pourrait mimer une infection

virale conduisant à l'activation de la voie cGAS-STING et à l'activation de cette dNTPase. Par ailleurs, il a été montré que le pool de dNTPs est sensible à l'accumulation des ROS et que les sous-unités RRM1 et RRM2 peuvent être oxydées (Wilhelm et al., 2016). Au regard de l'implication des ROS dans la NAFLD, nous pourrions suggérer que le pool de nucléotides est également oxydé lors de la division des hépatocytes stéatosiques. Il serait intéressant de corrélérer pour chaque culture d'hépatocytes le niveau de ROS intracellulaires aux différents niveaux de dNTPs.

La NAFLD se caractérise par une reprogrammation métabolique importante, qui nous laisse suggérer que la modulation de certaines voies métaboliques pourrait limiter la formation des dNTPs. La voie des pentoses phosphates (PP) est importante pour maintenir l'homéostasie du carbone qui sert notamment de précurseurs aux nucléotides via le ribose 5-phosphate. Ainsi, lorsque la prolifération est induite, la cellule restructure son métabolisme carboné afin de répondre à la demande en nucléotides (Stincone et al., 2015). La branche oxydative des PP permet la génération de ribose 5-phosphate à partir de glucose-6-phosphate et donc de la glycolyse. La branche des phosphorylases permet la génération de déoxyribose-1-phosphate et ribose-1-phosphate à partir de différents nucléosides phosphorylases (thymidine phosphorylase, uridinephosphorylase (UPase) et purine nucleoside phosphorylase (PNP)) (Tozzi et al., 2006) (Figure 43C). D'après les résultats de LCMS qui permettent la quantification de métabolites, il apparaît que le ribose phosphorylé ainsi que le septulose-7-phosphate (voie des PP) sont augmentés lors de la réplication des hépatocytes stéatosiques, suggérant ainsi que la voie des PP est bien fonctionnelle (Figure 43D).

Le couple d'oxydoréduction NAD⁺/NADH est essentiel pour de très nombreuses réactions biochimiques impliquant des réactions de transfert d'électrons : le NAD⁺ est l'accepteur d'électron alors que le NADH en est le donneur. Le NAD(H) sert de coenzyme dans des réactions du catabolisme ainsi que du métabolisme énergétique comme la glycolyse, la décarboxylation oxydative du pyruvate, le métabolisme de l'alcool, la β -oxydation ou encore le cycle de Krebs (Katsyuba et al., 2020). L'homéostasie du NAD⁺ est dérégulée lors de la NAFLD (Katsyuba et al., 2020). Des études menées sur des modèles murins de régime HFD (Yoshino et al., 2011), HFHS (Gariani et al., 2016), MCD (Gariani et al., 2017), etc... montrent qu'une diminution du NAD⁺ se produit lors de la stéatose de par une diminution de l'expression des enzymes de la voie de biosynthèse du NAD⁺ (NAMPT) et l'utilisation du NAD⁺ par les enzymes comme les sirtuines (désacétylation des protéines) ou PARP (PARylation et réparation de

l'ADN). L'ensemble de ces études montre que la restauration du pool de NAD⁺ à l'aide de précurseurs ou d'inhibiteurs des enzymes consommatrices, diminue la stéatose, la résistance à l'insuline et réduit le stress oxydant et celui du RE. La surexpression des URI (oncogène) dans le foie de souris, conduit dès huit semaines à une prolifération compensatoire associée à la présence de dommages de l'ADN (phosphorylation d'H2AX, RPA et CHK1) et l'activation de p53 suggérant un stress de réplication et la présence de cassures de l'ADN. La modification de la voie de synthèse *de novo* du NAD⁺ par la diminution du catabolisme du L-Tryptophane suffit à induire l'ensemble de ces lésions (Tummala et al., 2014). Le NAD⁺ est un métabolite important pour la réparation des dommages de l'ADN. Dans notre étude nous pourrions suggérer que la diminution du pool de NAD⁺ suffit à aggraver le stress de réplication. Le NAD⁺ pourrait notamment être utilisé pour la réparation des dommages de l'ADN par la protéine PARP. Cependant, par des analyses de LCMS, mes travaux montrent que les hépatocytes stéatosiques bloqués en réplication exhibent un ratio NAD⁺/NADH supérieur aux hépatocytes contrôles. Cependant, la balance du NAD⁺ est maintenue, c'est en fait le NADH qui est diminué dans les hépatocytes stéatosiques en réplication (Figure 43E). Bien que le pool de NAD⁺ soit identique aux cultures contrôles, nous pourrions émettre l'hypothèse que ce pool ne permet pas de réparer efficacement les lésions. Ainsi, il serait intéressant de traiter ces cultures avec un précurseur du NAD⁺, le Nicotinamide riboside, et d'analyser la présence de lésions de l'ADN. En complément, une étude a montré que la restauration du pool de NAD⁺ permet de rétablir le pool de purines par la voie de synthèse *de novo* de la sérine (Diehl et al., 2019). Le blocage de la voie de synthèse *de novo* de la sérine induit notamment une déplétion du pool de purines (Pacold et al., 2016). Sa dérégulation entraîne, dans des cellules cancéreuses, une diminution de la croissance tumorale, et vice-versa (Diehl et al., 2019). De façon intéressante, la sérine apparaît diminuée lors de la réplication des hépatocytes stéatosiques (Figure 43F). Bien que l'ensemble de ces données de métabolomique ne soit pas parfaitement clair, il apparaît que la modulation des voies métaboliques lors de la stéatose entraîne des répercussions non négligeables lors de la réplication de ces cellules. Une analyse approfondie par des flux métaboliques notamment au niveau de la voie de la sérine, des PP et du NAD⁺ permettrait de mieux définir ces modifications (Figure 43G).

En conclusion, la déplétion du pool de dNTPs lors de la réplication des hépatocytes stéatosiques n'est pas encore parfaitement comprise. La dérégulation du métabolisme des

sucres et des lipides ainsi que la production de ROS sont des acteurs principaux pouvant conduire à ce déséquilibre.

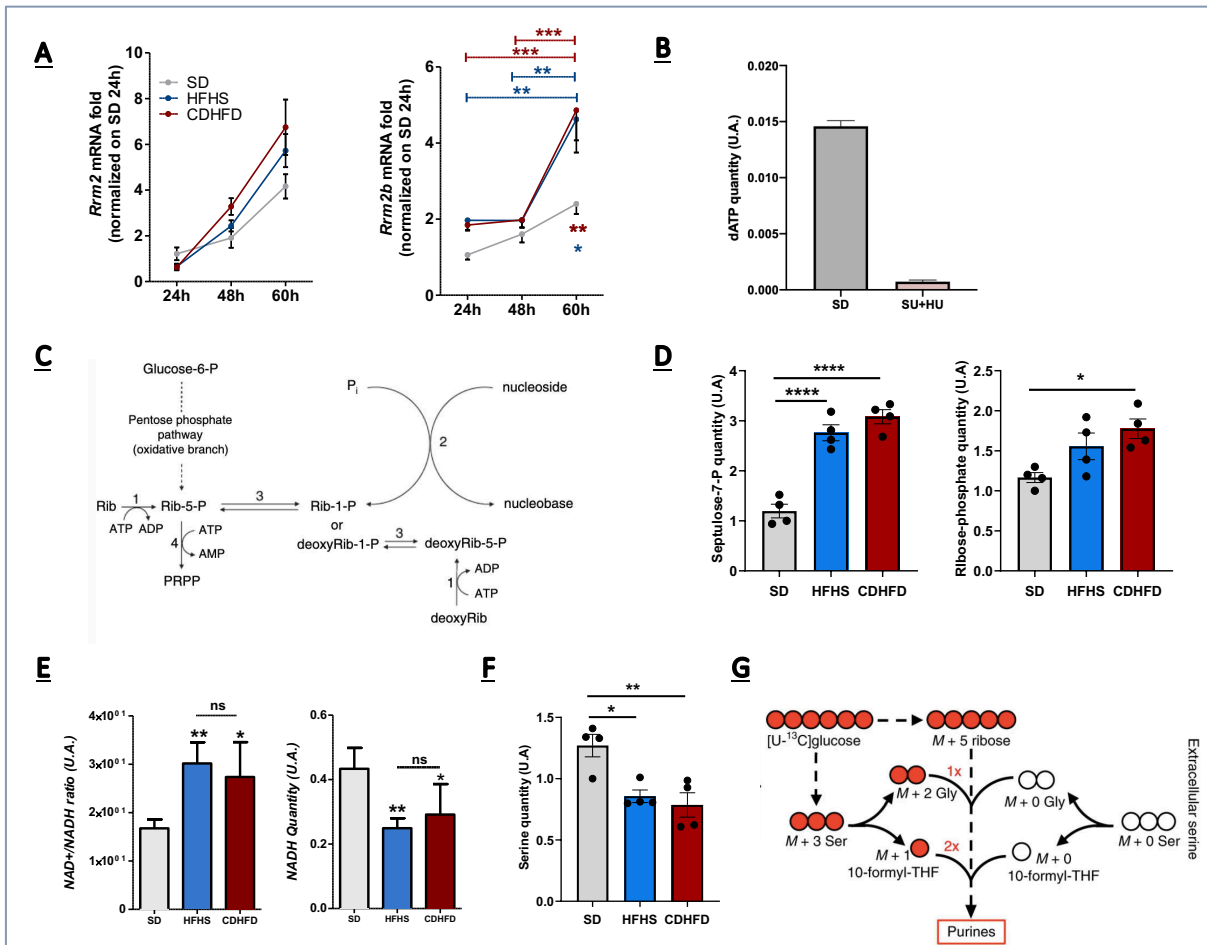


FIGURE 43. REGULATIONS METABOLIQUES POUVANT CONDUIRE A LA DEPLETION DU POOL DE dNTPs DANS L'HEPATOCTYTE STEATOSIQUE

A. Expression des messagers *Rrm2* et *Rrm2b* dans les cultures primaires d'hépatocytes (SD, HFHS et CDHFD), à 24h, 48h et 60h de culture, normalisée sur SD 24h. Les données représentent la moyenne ± SEM des échantillons (n=8 par groupe). Sur la cinétique de temps : Test one-way ANOVA avec une comparaison par le test de Turkey. ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05.

B. Quantification du dATP par LC-MS sur des hépatocytes SD traités ou non avec de l'hydroxyurée (HU). Traitement de 36h à 48h avec 10 µM.

C. Représentation schématique de la voie des PP. Le ribose-5-phosphate (Rib-5-P) est synthétisé par la branche oxydative. 1 : ribokinase ; 2 : nucléoside phosphorylases ; 3 : phosphopentomutase ; 4 : 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) synthétase.

D, E et F. Quantification de différents métabolites par LC-MS. Test one-way ANOVA avec une comparaison par le test de Turkey. ****P < 0.0001, ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05.

G. Exemple de flux métabolique par l'ajout de glucose radiomarqué permettant d'analyser la voie des PP, de la sérine et des purines. Schéma adapté de (Diehl et al., 2019).

3 L'activation de cGAS-STING participe-t-il à l'évolution de la maladie ?

Mes travaux de thèse montrent que la présence du stress de réplication dans les hépatocytes stéatosiques conduit à l'activation de la voie cGAS-STING. Bien que cette voie fût d'abord identifiée comme une voie de reconnaissance d'ADN intracellulaires de pathogènes, elle est maintenant caractérisée dans des pathologies liées à des défauts de réparation ou de réplication de l'ADN (Coquel et al., 2018; Gao et al., 2013a; Sauer et al., 2011). La protéine cGAS est le senseur d'ADN cytosolique capable de fixer directement des fragments d'ADN et de reconnaître les micronoyaux. STING est la protéine qui déclenche la signalisation intracellulaire en activant d'une part la voie NF- κ B et d'autre part la voie TBK1-IRF3-IFN de type I (Motwani et al., 2019). Mes travaux de thèse montrent, pour la première fois, l'activation de la voie senseur d'ADN dans une pathologie liée à des désordres métaboliques dans un contexte de réplication. De façon globale, les hépatocytes stéatosiques bloqués en phase S synthétisent cGAMP, ce qui reflète l'activation de la protéine cGAS. Cependant, l'expression du messenger n'est pas modifiée au cours du temps, et il semble que la protéine ne soit pas activée par la présence de micronoyaux puisque leur nombre ne diffère pas en fin de culture (Figure 44A & B). On peut donc facilement imaginer que de l'ADN néorépliqué se retrouve dans le cytosol pour activer la voie senseur d'ADN. Afin d'enrichir mes résultats, il serait intéressant d'effectuer des marquages d'ADN simple-brin, à l'aide d'un anticorps spécifique, pour montrer une localisation cytosolique de cet ADN. Par ailleurs, la forte expression de la protéine STING en fin de culture est dépendante de son activité transcriptionnelle puisqu'une forte augmentation de l'expression du messenger est détectée (Figure 44C). Nous montrons également l'activation de TBK1 (cible directe de STING) par sa phosphorylation ainsi qu'une augmentation de la synthèse protéique d'IFN de type I (IFN β) (Figure 44D & E). Cependant ces IFN ne sont pas détectables dans le surnageant des cellules en culture. Plusieurs hypothèses peuvent être suggérées : (1) la méthode utilisée (ELISA) n'est pas assez sensible pour détecter les IFN dans le surnageant ; (2) il faut allonger le temps de culture afin de permettre la sécrétion des IFN ; (3) La sécrétion n'a pas lieu suite à une régulation particulière. Toutefois, lorsque les IFN sont sécrétés, ils se fixent de façon autocrine et paracrine aux récepteurs IFNAR, ce qui conduit à l'expression de gènes antiviraux. Nous montrons d'ailleurs l'expression des gènes antiviraux *Mx1* et *Isg15*, dans nos modèles.

Également, les lésions de l'ADN pourraient conduire à l'activation de la voie non canonique de STING. Une étude a mis en évidence que la genèse de cassures double-brin de l'ADN par l'étoposide, dans les kératinocytes humains, provoque une induction transcriptionnelle de gènes pro-inflammatoires induite par NF- κ B. En amont, cette réponse implique les protéines ATM et PARP-1 qui permettent la formation d'un complexe cytosolique formé de TRAF6, p53, STING et IFI16. L'activation de STING, dans ce contexte, est indépendante de cGAS et de cGAMP. Ainsi, STING favorise l'activation de la voie NF- κ B plutôt que celle de TBK1-IRF3, induisant une expression différente de gènes pro-inflammatoires (IL-6 et CCL20 vs IFN de type I) (**Figures 44F**) (Dunphy et al., 2018). Il serait donc intéressant d'effectuer des expériences complémentaires afin de savoir si cette voie non-canonique est également activée lors du stress de réplication des hépatocytes stéatosiques.

Enfin, il est intéressant de noter que l'ajout de dNTPs à ces cultures est suffisant pour diminuer le stress de réplication, l'activation d'ATR mais également l'activation de la voie. En effet, l'ajout des dNTPs permet de freiner l'augmentation d'expression de la protéine STING et diminue fortement l'activation de TBK1 (**Figures 44G**). Ces résultats confirment que le stress de réplication dans l'hépatocyte stéatosique induit directement l'activation de la voie STING-TBK1.

Dans la NAFLD, l'implication de STING a été démontrée à l'aide de la souris STING^{gt} dans des modèles HFD et MCD. Ces souris STING^{gt} ne présentent pas d'élévation de leur masse pondérale après 6 mois de régime HFD et, montrent une diminution significative de la NASH lorsqu'elles sont soumises à un régime MCD (Yu et al., 2019). La suppression de STING dans tous les organes suffit à réduire la stéatose, l'inflammation et la fibrose. De façon intéressante, l'activation de STING par le DMXAA, chez des souris sous régime standard, permet l'installation d'une stéatose et d'une inflammation. L'étude de Luo et al., confirme ces résultats et montre que l'activation de STING dans les cellules myéloïdes est responsable de l'inflammation hépatique, de l'accumulation de lipides au niveau hépatocytaire et de l'activation des cellules étoilées pro-fibrosantes (Luo et al., 2018). Au regard de l'ensemble des données de la littérature, l'expression de STING dans l'hépatocyte sain semble nulle, mais est sujette à controverse dans la NAFLD. En effet, aux vues des dérégulations génétiques, épigénétiques et métaboliques qui interviennent dans cette pathologie, nous pourrions suggérer une modification de son expression. Mes travaux de thèse montrent que son expression est induite au niveau du messager et de la protéine lorsque les hépatocytes stéatosiques présentent un

ADN endommagé suite à un stress de réplication. Ainsi, des analyses complémentaires sont en cours afin d'identifier l'expression de l'ARN et de la protéine STING au sein du parenchyme de souris et de patients NAFLD. A la vue des premiers résultats, il semblerait que la protéine STING soit bien exprimée dans quelques hépatocytes. Des analyses à l'aide de co-marquages avec des protéines hépato-spécifiques (HNF-4) ou l'utilisation de la technique du RNAscope (détection d'ARN sur coupes de tissu) nous permettrons d'affirmer ce résultat.

Par ailleurs, l'activation de la voie cGAS-STING conduit généralement à la production d'IFN de type I afin de signaler aux cellules voisines ainsi qu'aux cellules immunitaires la présence d'une infection ou d'un problème intracellulaire (Barber, 2015). En réponse, les cellules immunitaires et notamment les lymphocytes T CD8+ éliminent cette cellule. Il serait donc intéressant de savoir si l'activation de la voie lors du stress de réplication des hépatocytes stéatosiques peut provoquer sa détection et son élimination. Ainsi, j'ai généré un modèle CRISPR/Cas9/AAV8 visant à éteindre l'expression de *Sting* uniquement au sein du compartiment hépatocytaire. Ce modèle nous permettra de répondre à plusieurs questions : **(1)** La protéine STING a-t-elle une fonction particulière dans l'hépatocyte ? **(2)** L'activation de la voie STING au sein d'hépatocytes endommagés provoque-t-elle leur élimination ? **(3)** STING agit-il comme une barrière face à la tumorigenèse ou participe-t-il à la tumorigenèse ? Ces questions sont importantes à la vue de résultats montrant des caractéristiques temporelles d'activation de STING permettant à la tumeur de se développer puis de croître par la manipulation du microenvironnement (Sokolowska and Nowis, 2018). Ainsi, il serait très enrichissant de regarder si la voie est activée dans les étapes plus tardives de la maladie comme lors de la cirrhose ou du CHC. Aujourd'hui, l'activation de la voie est notamment très étudiée dans les cancers et montre des effets pro- ou anti-tumorales en fonction des caractéristiques de l'environnement de la tumeur.

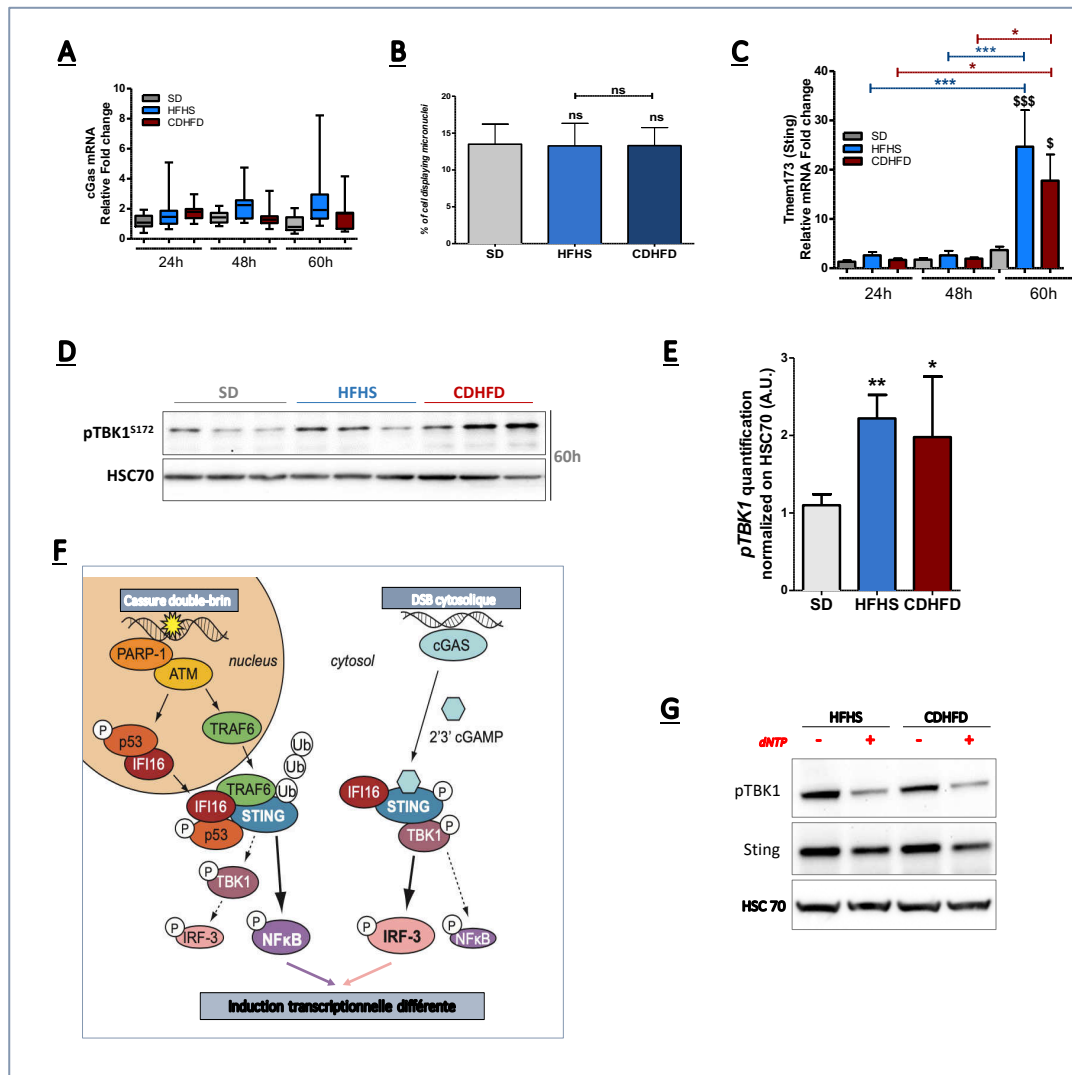


FIGURE 44. ACTIVATION DE LA VOIE CANONIQUE cGAS-STING LORS DU STRESS DE REPLICATION DES HEPATOCYTES STEATOSIQUES

A. Expression du messager *cGAS* dans les cultures primaires d'hépatocytes (SD, HFHS et CDHFD), à 24h, 48h et 60h de culture, normalisée sur SD 24h. Les données représentent la moyenne \pm SEM des échantillons ($n=8$ par groupe). Test one-way ANOVA avec une comparaison par le test de Turkey. **B.** Pourcentage de cellules possédant au moins un micronoyau dans les cultures primaires d'hépatocytes à 60h de culture. Test one-way ANOVA avec une comparaison par le test de Turkey. Ns : non-significatif **C.** Expression du messager *Sting* (*Tmem173*) dans les cultures primaires d'hépatocytes (SD, HFHS et CDHFD), à 24h, 48h et 60h de culture, normalisée sur SD 24h. Les données représentent la moyenne \pm SEM des échantillons ($n=8$ par groupe). Sur la cinétique de temps : Test one-way ANOVA avec une comparaison par le test de Turkey. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. A 60h, test one-way ANOVA avec une comparaison par le test de Turkey \$\$\$ $P < 0.001$, \$ $P < 0.05$. **D.** Western-blot représentant la phosphorylation de TBK1 à 60h de culture ($n=3$ par condition). **E.** Quantification du western blot. pTBK1 est normalisée à HSC70. Test one-way ANOVA avec une comparaison par le test de Turkey. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ **F.** Représentation schématique de la voie non-canonique de STING. **G.** Western blot représentant des cultures primaires HFHS et CDHFD traitées ou non avec 20 μm de dATP, dCTP, dGTP et thymidine. Le traitement est effectué à 36h puis renouvelé à 48h. Les protéines sont extraites à 60h. Résultats représentatifs de 3 cultures primaires HFHS et CDHFD.

4 Les cellules endommagées représentent-elles un risque de transformation ?

L'une des questions importantes à la suite de ce travail est de savoir si les cellules endommagées peuvent participer à des événements de transformation ? Comme nous l'avons discuté, la présence de cassures de l'ADN dans les hépatocytes stéatosiques en division nous permet de suggérer que certains réarrangements chromosomiques peuvent survenir, et seraient à l'origine d'évènements de transformation. Des données de la littérature viennent conforter cette hypothèse. En effet, des études de transcriptome et de protéome ont montré l'existence d'un lien causal entre la NAFLD et l'activation de la voie ATM, chez le patient (n=6 contrôles, n=6 NASH) (Viswanathan et al., 2020). De plus, une étude génomique réalisée sur 357 tumeurs primaires hépatiques humaines (214 CHC, 122 cholangiocarcinomes et 21 mixtes) montre que 26% d'entre elles exhibent au moins une mutation dans un gène du DDR (Lin et al., 2019). Ces mutations sont principalement retrouvées dans les gènes *ATM* et *BRCA1/2* (5% et 4,8% respectivement). La présence de ces mutations dans les gènes du DDR corrèle positivement avec un fort potentiel mutagène et une plus forte instabilité chromosomique. De même, une étude génomique du groupe de Jessica Zucman-Rossi montre que les gènes *ATM* et *ATR* sont retrouvés mutés dans 5,5% et 2,1 % des CHC, respectivement (Schulze et al., 2015). De façon simplifiée, il est maintenant bien connu que les mutations essentielles pour le développement d'un CHC sont d'abord celles permettant la réactivation de la télomérase, puis celles induisant la perte de fonction de p53 ou le gain de fonction de la protéine β -caténine. Cependant, dans cette étude il apparaît que les mutations dans les gènes *ATM* ou *ATR* sont exclusives de celles de p53 (Figure 45A). De plus, la perte d'expression des protéines ATM et ATR n'est pas encore bien définie dans l'ordre d'acquisition des mutations du paysage tumoral. Il est important de noter que la plupart des études de génomiques déjà publiées sur le CHC ne sont réalisées qu'avec un très faible échantillonnage de CHC émergent sur NAFLD et qu'aujourd'hui il n'a pas encore été montré de signature génomique particulière de ces derniers. Dans les modèles murins, le rôle de la protéine ATM apparaît essentiel dans la NAFLD aussi bien dans le contrôle des ROS que des dommages de l'ADN. Cependant, de façon étrange, les souris *ATM*^{-/-} injectées au DEN sont réfractaires à la tumorigenèse (Teoh et al., 2010). C'est l'activation de p53 induite par l'activation d'ATR et de CHK1 qui provoquent l'arrêt du cycle cellulaire et la mise en sénescence. Dans ce modèle la suppression totale d'ATM provoque

l'activation d'ATR qui va alors agir comme un frein à la tumorigenèse (« gatekeeper »). Cette notion est confirmée par une autre étude qui montre que l'inactivation de la voie ATR, par la suppression du cofacteur BRUCE (**B**IR Repeat containing **U**biquitin-**C**onjugating **E**nzyme), induit un stress de réplication et une aggravation de la tumorigenèse dans un modèle d'injection au DEN (Ge et al., 2019). L'activation des acteurs du DDR apparaît donc essentielle pour éviter tout élément de transformation.

Mes travaux de thèse mettent en lumière la présence d'un stress de réplication lors de la division des hépatocytes stéatosiques. Ces résultats permettent de suggérer que ces hépatocytes endommagés pourraient initier des événements de transformation. Ainsi, il serait intéressant d'apporter à des souris sous régime (HFHS, CDHFD, etc...) des molécules pouvant réduire le stress de réplication, comme des nucléosides, des activateurs de la voie des PP ou de la voie du NAD⁺ (Nicotinamide riboside) et d'analyser la tumorigenèse. Enfin, la mise sous régime de modèles murins génétiquement modifiés (activation permanente de RRM) pourrait également permettre de répondre à cette question.

De plus, au regard du manque de données, il serait intéressant de définir si la perte d'expression de la protéine ATR et/ou ATM peut-être un événement initial de transformation dans un contexte de NAFLD. Lors de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de générer des modèles murins CRISPR/Cas9, comme il a été expliqué précédemment. Des expériences préliminaires sur des souris mutées pour les gènes *Atr*, *Atm* ou les deux (DKO) et placées sous régime CDHFD pendant seize mois ont été menées. De façon globale, nous avons remarqué une hétérogénéité au sein même des différents groupes mutés. Cependant sur les premières données *in vivo*, il apparaît que les souris mutées pour le gène *Atm* (ATM crispered - ATMcr) présentent une moins forte installation de la pathologie, corrélée avec la présence de faibles dommages hépatocellulaires (**Figure 45B & C**). Les souris mutées pour le gène *Atr* (ATR crispered – ATRcr), bien que non significative, présentent la même tendance phénotypique. L'analyse de la tumorigenèse révèle une incidence tumorale de 27% pour les ROSAc (contrôles), 9% et 18% pour les souris ATRcr et ATMcr respectivement et 55% pour les souris DKOcr (**Figure 45D**). De façon surprenante, la mutation de l'un des deux gènes diminue la tumorigenèse et améliore les signes cliniques de la pathologie, alors que la mutation des deux gènes augmente significativement l'incidence tumorale. A la vue des données publiées discutées précédemment, nous pouvons suggérer que l'absence d'un des acteurs du DDR entraîne une forte activation du second qui va alors activer p53 et induire la sénescence. Par la suite, il sera

donc intéressant d'analyser les marqueurs de sénescence afin de les corrélés à l'incidence tumorale (expression de p21, p16, activité β -galactosidase sur coupes de tissus). L'apoptose et la prolifération compensatoire étant des acteurs majeurs dans l'installation d'évènements tumoraux, l'analyse de ses marqueurs est importante. Des premières expériences montrent que l'apoptose, analysée par le clivage de la caspase-3, est fortement diminuée lorsque la protéine ATM est mutée, ce qui pourrait expliquer l'amélioration des signes cliniques. En effet, s'il y a moins de mort cellulaire, il y a également moins de prolifération tissulaire et donc moins d'évènements pouvant conduire à de l'instabilité génomique (Figure 45E). Ces premiers résultats suggèrent donc que les protéines du DDR exercent des fonctions essentielles dans le maintien de l'intégrité génomique, lors de la NAFLD. Des études histologiques devront ensuite être menées afin de mieux comprendre ces phénomènes.

En conclusion, il serait intéressant de mieux caractériser la présence des cellules endommagées lors de la NAFLD, et de savoir si elles participent ou non à la progression de la pathologie. Ces études pourraient par la suite aboutir à l'identification de protéines, qui, une fois ciblées par des molécules, permettraient de ralentir voire d'abolir l'avancée de la maladie.

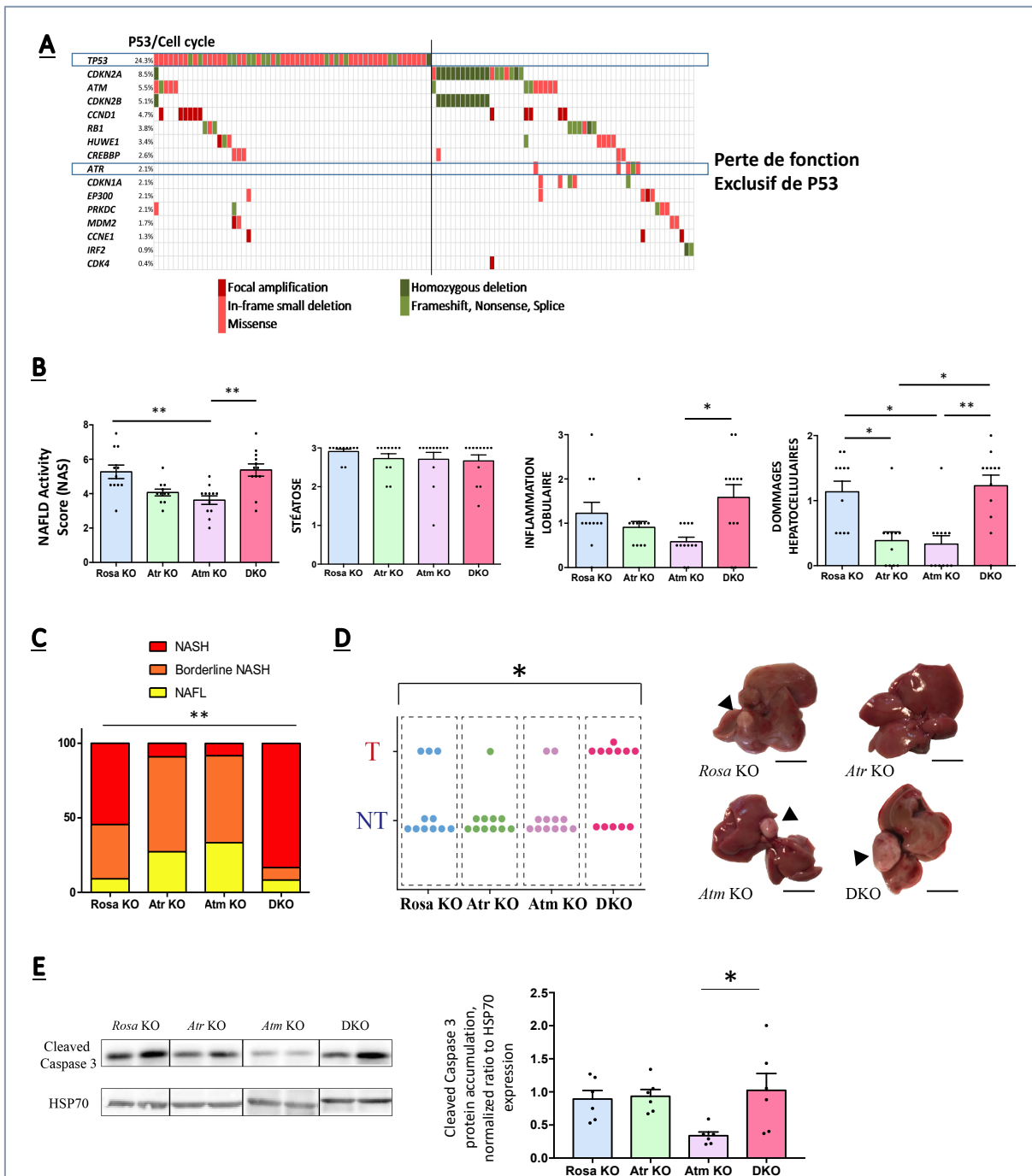


FIGURE 45. ROLE D'ATR ET ATM DANS LA CARCINOGENESE HEPATIQUE SUR FOND NAFLD

A. Mutations retrouvées dans une cohorte de CHC. **B.** Score lésionnel à partir de données histologiques. Test de Kruskal-Wallis avec une comparaison multiple de Dunn (n=11 animaux par groupe) $**P < 0.01$, $*P < 0.05$. (DKO : ATR et ATM mutés par Crispr/Cas9). **C.** Répartition du stade de NAFLD par animaux. Test du Khi-deux. **D.** Distribution de la tumorigénèse au sein des groupes. Test du Khi-deux. Images représentatives d'un foie tumoral pour chaque groupe. La flèche indique une tumeur. **E.** Western blot Caspase 3 clivée et HSP(HSC)70 sur extraits protéiques de foie total. Blot représentatif de n=5 animaux. La quantification est représentée à droite.

CONCLUSION

Ce travail de thèse montre que la division de l'hépatocyte stéatosique est altérée et, est associée à la présence de dommages de l'ADN. Ces cellules présentent un stress de réplication dont la cause principale est la dérégulation du pool de dNTPs. Cet ensemble conduit à la libération d'ADN nucléaire dans le cytosol et à l'activation de la voie senseur d'ADN : cGAS-STING. A la suite de ces résultats il sera donc intéressant d'étudier les altérations métaboliques conduisant à la dérégulation des voies de synthèse des nucléotides et des dNTPs. De plus, des résultats préliminaires montrent que la protéine ATR est essentielle pour maintenir une balance réplication/réparation. Il sera important de définir si cette protéine, à elle seule, peut être un marqueur d'évolution de la pathologie. La présence de cellules endommagées renfermant une rupture de leur stabilité génomique, dans le tissu hépatique stéatosique, pourrait permettre la transformation cellulaire. Enfin, mes résultats mettent en lumière, pour la première fois, la présence et l'activation de la protéine STING dans l'hépatocyte stéatosique en division. Elle pourrait notamment être essentielle pour le contrôle et l'élimination des cellules endommagées. De façon intéressante, la connaissance scientifique sur cette protéine devient de plus en plus importante, et pourra bientôt permettre de mieux caractériser son rôle pro- et anti-tumoral. Par la suite, il sera primordial de préciser le rôle de STING dans le carcinome hépatocellulaire induit sur fond de NAFLD afin de savoir s'il agit comme un véritable acteur suppresseur de tumeurs.

Annexes

En annexe de ce manuscrit, vous trouverez trois revues (1. – 3.) que j'ai co-écrites avec ma directrice de thèse ainsi qu'un article scientifique du laboratoire pour lequel j'ai participé.

1. « **Polyploidy in liver development, homeostasis and disease** ». [Donné R](#), Saroul-Aïnama M., Cordier P., Celton-Morizur S., Desdouets C. **Nature Review Gastroenterology and Hepatology** 2020., doi.org/10.1038/s41575-020-0284-x

2. « **Cellular and Molecular Mechanisms Controlling Ploidy** ». [Donné R](#), Bou-Nader M and Desdouets C. **Ref module in Life science**, 2018

3.« **Hepatic polyploidy: Dr Jekyll or Mr Hyde** ». [Donné R](#), Saroul M, Maillet V, Celton-Morizur S, Desdouets C. **Médecine Science** 2019., doi: 10.1051/medsci/2019094.

4. « **Hepatospecific ablation of p38 α MAPK governs liver regeneration through modulation of inflammatory response to CCl4-induced acute injury** ». Fortier M, Cadoux M, Boussetta N, Pham S, [Donné R](#), Couty JP, Desdouets C & Celton-Morizur S. **Scientific Report**. 2019 Aug 29. » doi.org/10.1038/s41598-019-51175-z

En quatrième de couverture vous trouverez un poster présenté lors de la fête de la science (2017-2018) à l'institut Cochin. Ce poster a été réalisé par Manon Fortier et moi-même.

OPEN

Hepatospecific ablation of p38 α MAPK governs liver regeneration through modulation of inflammatory response to CCl₄-induced acute injury

Manon Fortier^{1,2}, Mathilde Cadoux^{1,2}, Nadia Boussetta², Sandrine Pham^{1,2}, Romain Donn  ^{1,2}, Jean-Pierre Couty^{1,2}, Chantal Desdouets^{1,2} & Séverine Celton-Morizur^{1,2} 

Mammalian p38 α MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) transduces a variety of extracellular signals that regulate cellular processes, such as inflammation, differentiation, proliferation or apoptosis. In the liver, depending of the physiopathological context, p38 α acts as a negative regulator of hepatocyte proliferation as well as a promotor of inflammatory processes. However, its function during an acute injury, in adult liver, remains uncharacterized. In this study, using mice that are deficient in p38 α specifically in mature hepatocytes, we unexpectedly found that lack of p38 α protected against acute injury induced by CCl₄ compound. We demonstrated that the hepatoprotective effect alleviated ROS accumulation and shaped the inflammatory response to promote efficient tissue repair. Mechanistically, we provided strong evidence that Ccl2/Ccl5 chemokines were crucial for a proper hepatoprotective response observed secondary to p38 α ablation. Indeed, antibody blockade of Ccl2/Ccl5 was sufficient to abrogate hepatoprotection through a concomitant decrease of both inflammatory cells recruitment and antioxidative response that result ultimately in higher liver damages. Our findings suggest that targeting p38 α expression and consequently orientating immune response may represent an attractive approach to favor tissue recovery after acute liver injury.

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

p38 Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are essential for the cellular response against injury by integrating a plethora of pathways including growth, inflammation, metabolism and apoptosis^{12–14}. Among all p38 isoforms, p38 α (MAPK14) is the best characterized and expressed in most cell types¹⁵. As mice lacking p38 α isoform die in utero due to angiogenic defects in the placenta and peripheral vessels^{16–18}, mice models harboring tissue-specific deletion of p38 α have been developed. During liver regeneration following partial hepatectomy, mice with specific ablation of p38 α in hepatocytes early in life exhibited enhanced hepatocyte proliferation revealing that p38 α acts as an inhibitor of hepatocyte proliferation by antagonizing the activity of the JNK–c-Jun pathway^{19–21}. By contrast, liver-specific ablation of p38 α during chronic biliary cirrhosis reduced hepatocyte cell growth, caused mitotic blockade and cytokinesis failure impairing dramatically mice lifespan²². Studies in

¹Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Team (Proliferation, Stress and Liver Physiopathology), F-75006, Paris, France. ²Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Paris Descartes University, Paris, France. Chantal Desdouets and Séverine Celton-Morizur contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.C.-M. (email: severine.morizur@inserm.fr)

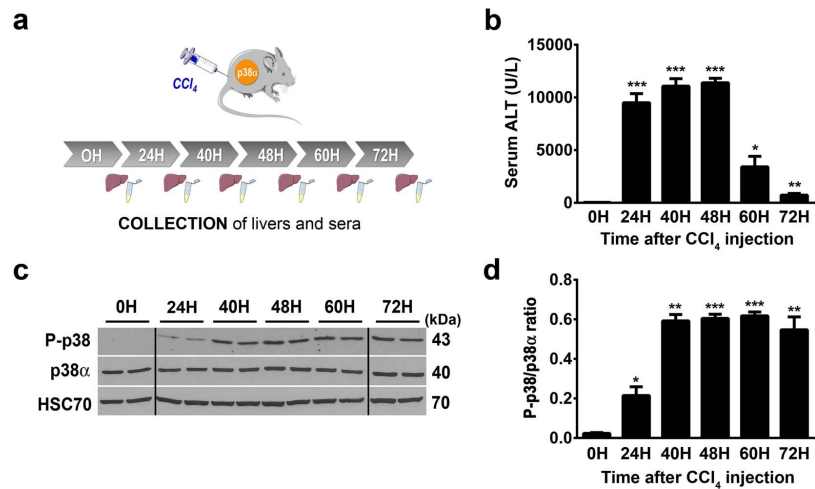


Figure 1. p38 α is activated during acute CCl₄ exposure. (a) Schematic representation of experimental procedure for CCl₄ injection in control mice (CTR). (b) Average alanine aminotransferase (ALT) levels in CTR sera samples before (0H) and after (24H to 72H) CCl₄ exposure. Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 6$ per group); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (two-tailed t-test), as compared to 0H. (c) Phospho-p38 and p38 α expression in liver of CTR mice before (0H) and after (24H to 72H) CCl₄ exposure. HSC70 served as a loading control. Lanes showed samples from independent biological replicates and were noncontiguous (black line). The displayed figure was cropped and the original images are part of the Supplementary Data. (d) Densitometry analysis of P-p38 vs p38 α protein levels before (0H) and after (24H to 72H) CCl₄ injection. Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 3$ per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (two-tailed t-test) as compared to 0H.

thioacetamide (TAA) and DiEthyl-Nitrosamine (DEN)-induced HCC mice models revealed that p38 α acts as a tumor suppressor by curtailing ROS accumulation protecting against cell death, subsequent compensatory hepatocyte proliferation and liver tumor development^{23–25}. Collectively, these studies highlight that p38 α displays several functions that critically depend on the physiopathological context. However, the impact of p38 α deletion during acute liver injury in completely mature adult hepatocytes is still an open question.

In that context, to determine the role of p38 in the adult liver, we developed a mice model allowing the deletion of p38 α in mature hepatocytes. Using acute liver injury model, our findings reveal quite unexpectedly that p38 α deletion is translated into a potent hepatoprotective response against liver injury. Interestingly, we demonstrated that p38 α deficiency instructs the inflammatory response to promote efficient tissue repair.

Results

p38 α deletion protects mice against acute hepatocellular damage. Acute administration of carbon tetrachloride (CCl₄), is widely used in experimental animal models of liver failure that mimics human hepatic response against toxic compounds^{26,27}. CCl₄ is a strong hepatotoxin that induces overproduction of ROS, lipid peroxidation of membranes, causes hepatocyte death and inflammation, resulting to severe hepatotoxicity^{28,29}. Protection against apoptosis, inflammation and oxidative stress associated with a pro-regenerative response of the hepatocytes are crucial to ensure efficient tissue repair after detrimental CCl₄ exposure. First, to evaluate the activity of p38 α during acute liver injury, control mice were injected by a single dose of CCl₄ and liver and sera were collected during time course kinetic (Fig. 1a). A single-dose of CCl₄ induced significant liver injuries reflected by hepatocyte cytolysis that we monitored by the evaluation of ALT (Alanine Transaminase) plasma level (Fig. 1b). Indeed, ALT level peaked from 24 and 48 hours (injury phase) post-injection of CCl₄ and gradually decreased at 60 and 72 hours (recovery phase) (Fig. 1b). In that context, we investigated the profile of p38 α phosphorylation/activation in the injured liver. To that end, p38 α and Thr180/Tyr182 phospho-p38 protein levels were measured by western blot analysis in a time course experiment (Fig. 1c,d). We first observed that the expression of p38 α was stable all along the kinetic (Fig. 1c). Second, whereas in the resting liver (0H) we detected a weaker signal of P-p38, the phosphorylation of p38 increased gradually after CCl₄ exposure, concomitant with the increasing tissue injury observed in the liver (Figs 1b and 2b,c) and reached a plateau at 40 hours until the end of the kinetic (Fig. 1c,d). These findings indicated that acute liver injury mediated by CCl₄ exposure induced specific activation of p38 α .

To better characterize the role of p38 α during CCl₄ injury, hepatocyte-specific deletion of p38 α (p38 $\alpha^{\Delta H}$) was achieved by crossing mice carrying conditional loxP-flanked p38 α alleles (p38 $\alpha^{fl/fl}$) with transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of the hepatospecific transthyretin promoter (TTR-Cre

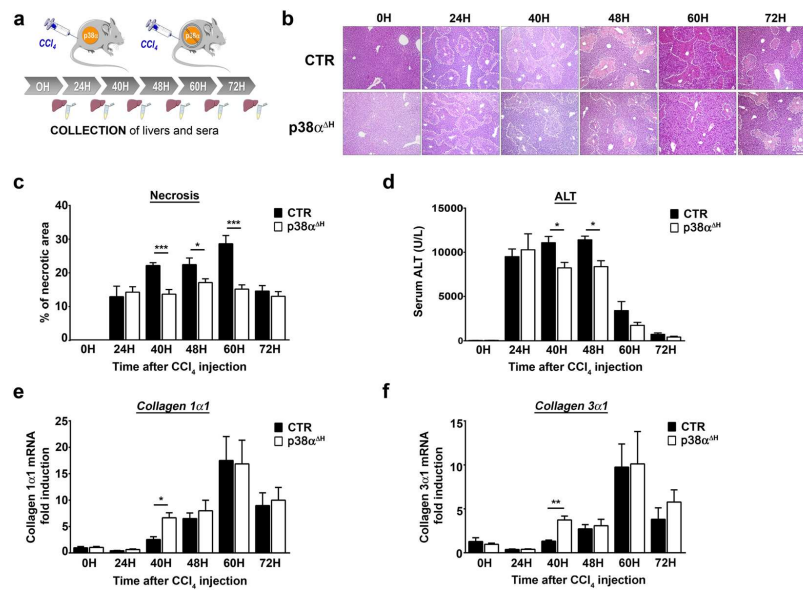


Figure 2. p38 α ablation in mature hepatocyte is hepatoprotective against CCl₄-induced liver injury. (a) Schematic representation of experimental procedure for CCl₄ injection in control mice (CTR) and p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice. (b) Representative haematoxylin and eosin (H&E) staining of liver tissue sections from CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice at different time points after CCl₄ injection. (c) Quantification of necrotic area from H&E stained CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver sections at indicated time points after CCl₄ injection. Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 7$ per group); * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ (two-tailed t-test). Average alanine aminotransferase (ALT) levels in CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ sera samples at indicated time points after CCl₄ injection. Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 6$ per group); * $p < 0.05$ (two-tailed t-test). (e, f) Relative mRNA level of *Collagen 1 α 1* (e) and *Collagen 3 α 1* (f) measured by quantitative PCR in CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver samples at indicated time points after CCl₄ injection. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 6$ per group); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (two-tailed t-test).

Tam³¹). Tamoxifen diet induces very efficient ablation of p38 α expression in the liver of p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice even though some remaining expression of p38 α was visible due to the presence of nonparenchymal cells that are not targeted by the TTR-Cre transgene (Supplementary Fig. 1a). Interestingly, following p38 α hepatospecific deletion (p38 $\alpha^{\Delta H}$) and under steady state conditions, we did not observe any signs of alterations within liver parenchyma. From these results, we concluded that p38 α expression in adult hepatocyte is not absolutely required to maintain liver homeostasis during steady-state conditions.

p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice and their respective controls were challenged by a single CCl₄ injection and we monitored in time the hepatocyte cytolysis and liver damage (Fig. 2a). H&E staining of liver sections indicate that significant necrosis was already present from 24 hours in the liver of p38 $\alpha^{\Delta H}$ and control mice (Fig. 2b, c, Supplementary Fig. 1b). Interestingly, necrotic areas increased gradually and peaked at 60 hours post-CCl₄, to diminish at 72 hours in the liver of control mice (Fig. 2b, c). However, although necrotic areas were still evident between 40 and 48 hours in the liver of p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice, the intensity of necrosis was markedly reduced as compared to the controls (Fig. 2b, c). Accordingly, ALT levels in p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice remained strictly lower compared to control mice at these time points (Fig. 2d). Furthermore, cleaved caspase-3 staining was used to examine apoptosis of hepatocytes in both group of mice at 24, 40 and 48 hours post-CCl₄ treatment (Supplementary Fig. 1c). Our observations revealed that apoptotic response consecutive to CCl₄ challenge was not impaired in p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver and could not account for the decrease of both necrotic areas and ALT levels observed in p38 α -related deficiency context (Supplementary Fig. 1c, d). To rule out the possibility that differential CCl₄ bioactivation could be responsible for the variation in the liver injury between control and p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice, we measured mRNA level of *cyp2e1*, a major CCl₄-metabolizing enzyme. First, we did not find difference in the mRNA level of *cyp2e1* under steady state conditions between both groups of mice (Supplementary Fig. 1e). Moreover, consistent with previous reports^{32,33}, the CCl₄ treatment resulted in a decrease of *cyp2e1* mRNA level between 12 and 24 hours, indicating the same metabolism process of CCl₄ compound in both groups of mice (Supplementary Fig. 1e). Interestingly, we monitored collagens 1 α 1 (Fig. 2e) and 3 α 1 (Fig. 2f) mRNA levels and we found an up-regulation at 40 hours in the liver of p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice as compared to control one (Fig. 2e, f), reflecting an earlier tissue repair response under

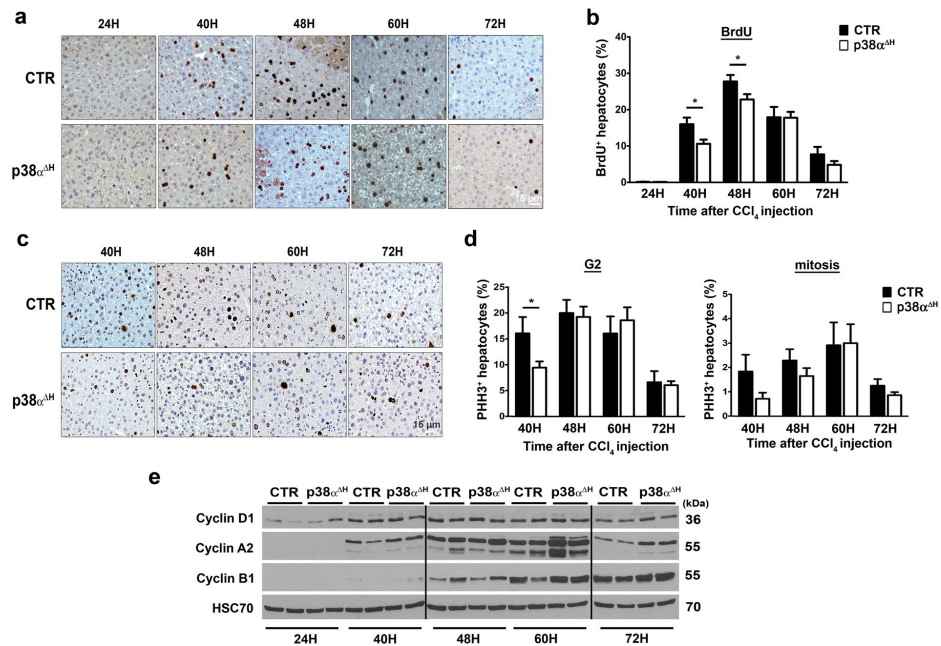


Figure 3. p38 α deficiency does not favor hepatocyte proliferation during acute injury. (a) Representative BrdU immunohistochemistry of control (CTR) and p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver tissue at indicated time points after CCl₄ injection. (b) Quantitative analysis of BrdU labeled CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver sections (percentage of BrdU⁺ hepatocytes). Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 6$ per group); * $p < 0.05$ (two-tailed t-test). (c) Representative Phospho-Histone H3 (PHH3) immunohistochemistry of CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver tissue at indicated time points after CCl₄ injection. (d) Quantitative analysis of PHH3⁺ hepatocytes in G2 phase (left panel) and mitosis (right panel) in CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ livers (histologic distinction of PHH3⁺ hepatocytes). Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 6$ per group). * $p < 0.05$ (two-tailed t-test). (e) Immunoblot of proteins regulating cell cycle progression (Cyclin D1, A2 and B1) in CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver samples at indicated time points after CCl₄ injection. Two representative samples are shown for each analyzed point. HSC70 served as a loading control. Lanes were noncontiguous (black line). The displayed figure was cropped and the original images are part of the Supplementary Data.

p38 α deficiency. These findings suggest that p38 α ablation in adult hepatocytes both buffers liver injury and favors a better response in tissue recovery.

Proliferative response induced by acute CCl₄ was not affected by p38 α ablation. Since p38 α MAPK has been largely reported as a negative regulator of cellular proliferation controlling the induction of both G1/S and G2/M cell cycle checkpoints^{34–37}, we checked the consequences of p38 α deficiency on hepatocyte proliferative response after CCl₄ exposure. We monitored bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (Fig. 3a) in both control and p38 $\alpha^{\Delta H}$ livers during time-course kinetic. BrdU-positive hepatocytes were detected as soon as 40 hours post-CCl₄ and the percentage of BrdU-positive hepatocytes peaked at 48 hours, to gradually decrease afterward, in both mice groups (Fig. 3b). Contrary to what we expected, we did not observe a global enrichment of BrdU-positive hepatocytes in p38 $\alpha^{\Delta H}$ livers. In fact, BrdU immune-reactive cells were modestly decreased in p38 $\alpha^{\Delta H}$ livers compared to control livers at 40 and 48 hours post-CCl₄ exposure (Fig. 3b). To reinforce these interesting results, we analyzed G2 phase and mitosis progression using PHH3 labeling (Fig. 3c,d). In lines with the assessment of BrdU analysis in p38 $\alpha^{\Delta H}$ livers, the percentage of PHH3-positive hepatocytes was slightly reduced at 40 hours after CCl₄ exposure compared to control livers (Fig. 3d). Moreover, molecular analysis of key drivers of cell cycle progression (cyclin D1 (G1 phase), A2 (S phase) and B1 (G2/M)), did not reveal significant differences between the two groups of mice (Fig. 3e). Altogether, these data revealed that p38 α deficiency does not impact on hepatocyte cell cycle during acute injury. Importantly, our findings revealed that the hepatoprotective response driven by p38 α deletion is largely independent of its known role of cell cycle checkpoint.

Enhancement of antioxidative response protect against CCl₄-mediated injury in the absence of p38 α . Since CCl₄ causes severe liver cell damages through a strong elevation of oxidative stress response^{38,39}

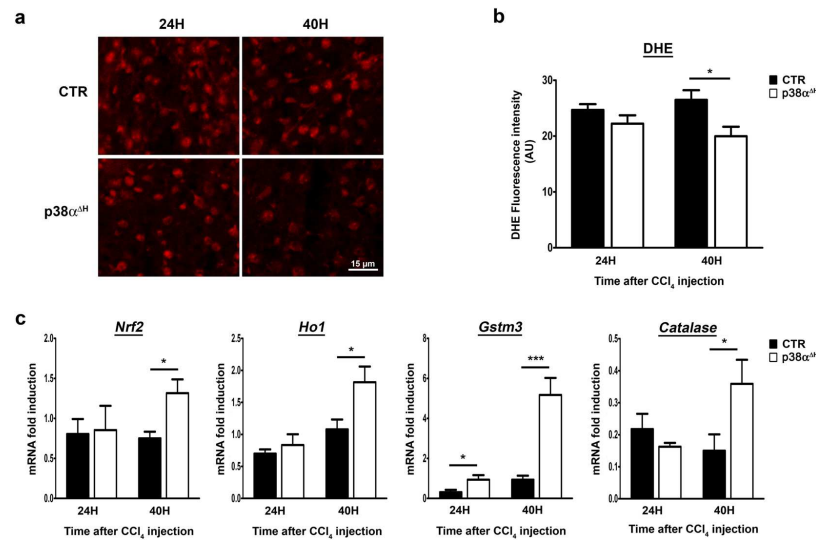


Figure 4. Enhancement of the anti-oxidant response in the liver of p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice after acute CCl₄ exposure. (a) Representative images of Dihydroethidium (DHE) staining of control (CTR) and p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver sections at 24 and 40 hours post-CCl₄. (b) Quantification of DHE fluorescence intensity (arbitrary unit) obtained from staining of CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver sections at 24 and 40 hours post-CCl₄. Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 5$ per group). * $p < 0.05$ (two-tailed t-test). (c) Relative mRNA level of antioxidant genes (*Nrf2*, *Ho1*, *Gstm3* and *Catalase*) measured by quantitative PCR in CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver samples at 24 and 40 hours post-CCl₄. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 6$ per group). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (two-tailed t-test).

and that p38 α is a mediator of the cellular redox balance in hepatocytes^{24,25,40}, we tested whether the hepatoprotective effect observed after p38 α ablation could be attributable to an enhancement of the antioxidant response.

The general level of hepatic ROS was assessed by the fluorescent dye dihydroethidine (DHE) on fresh frozen liver sections from both control and p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice (Fig. 4a,b). Whereas no significant differences in ROS levels were observed at 24 hours post-CCl₄ in the liver of both p38 $\alpha^{\Delta H}$ and control mice, we did notice, at 40 hours, that ROS accumulation was largely decreased in p38 $\alpha^{\Delta H}$ livers (Fig. 4a,b). This observation indicated that p38 α deficiency dampened oxidative stress. To gain insights into the signaling pathway, we investigated the Nrf2-mediated signaling as an essential component for the inhibition of oxidative stress in mice during acute liver injury^{41–43}. Interestingly, we found that Nrf2 transcripts (Fig. 4c) and its downstream effectors Ho-1, Catalase and Gstm3 (Fig. 4c) were significantly enhanced in p38 $\alpha^{\Delta H}$ compared to control livers at 40 hours post-CCl₄ injury. These findings suggested that p38 α deficiency is translated into a protective effect against CCl₄-induced ROS formation at least through Nrf2 pathway.

p38 α deletion impacts on the inflammatory response during acute liver injury. Interestingly, at the level of H&E staining, we observed along the kinetic read-out, a substantial increase of inflammatory cells within necrotic areas in p38 $\alpha^{\Delta H}$ compared to control livers (Fig. 5a). We then extracted immune cells from the livers and confirmed their increase in p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice compared to control mice at 40 hours after CCl₄ injury (Fig. 5b). Interestingly, at 60 hours, the number of immune cells decreased in p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver but still remained higher than in control liver (Fig. 5b). To go further, we monitored chemotactic signals, which play an essential role during acute liver injury by managing the migration of immune cells⁴⁴. We found a significant up-regulation of both Ccl2 (Fig. 5c) and Ccl5 (Fig. 5d) at 40 hours post-CCl₄ challenge, suggesting that these chemokines favor the drastic immune cell recruitment in p38 $\alpha^{\Delta H}$ livers.

Next, we evaluated common genes involved in inflammation on whole liver tissue from both groups of mice. Importantly, at 40 hours post-injury, we found a concomitant up-regulation of *Tnf α* (Fig. 5e) and *Tgf β* (Fig. 5f) expression without modifications in *Il1 β* mRNA level (Fig. 5g) suggesting a particular inflammatory flavor sustaining tissue repair. Altogether, our data suggested that the increase in immune cells could be involved into the hepatoprotective response driven by p38 α ablation.

To finally prove that the recruitment of the immune cells mediated the hepatoprotective response driven by p38 α deletion, we blocked Ccl2/Ccl5 signals using specific neutralizing antibodies 5 hours before CCl₄ exposure (Fig. 6a). We validated the effect of antibodies blockade by counting immune populations extracted from the

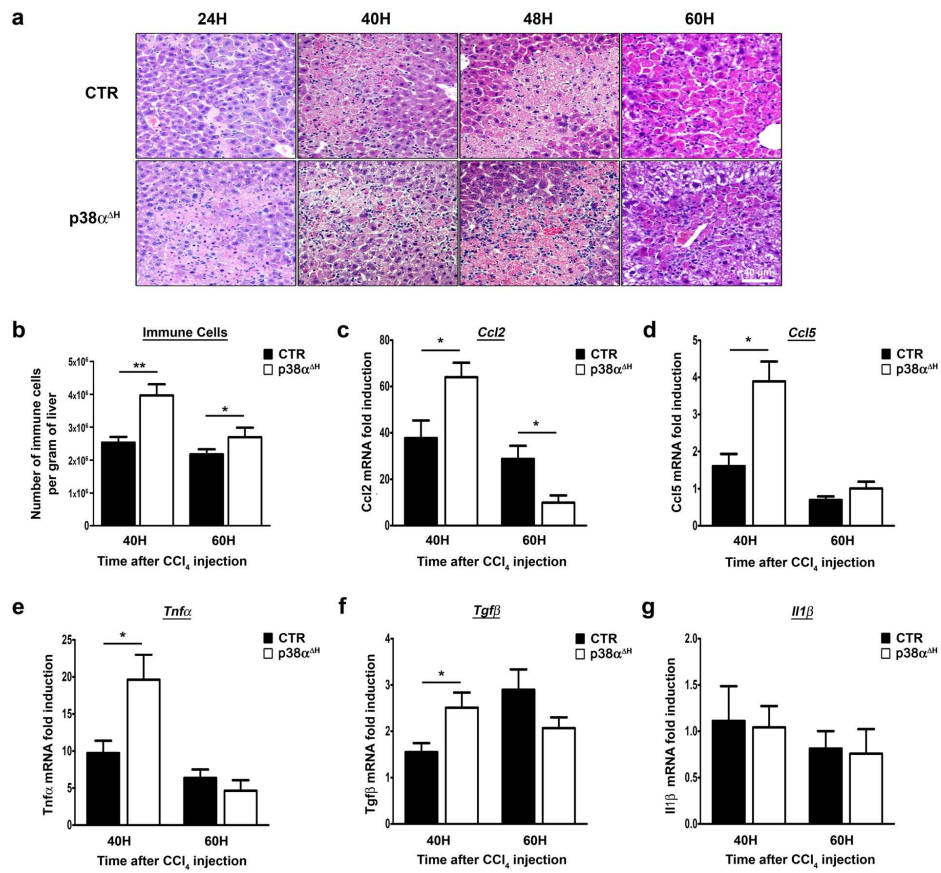


Figure 5. p38 α deficiency instructs the inflammatory response to promote efficient tissue repair. (a) Representative photomicrographs of immune infiltration with H&E staining in control (CTR) and p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver sections at different time points after CCl₄ injection. (b) Number of hepatic immune cells per gram of liver in CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice at 40 and 60 hours post-CCl₄. Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 5$ per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (two-tailed t-test). (c–g) Relative mRNA level of *Ccl2*, *Ccl5*, *Tnf α* , *Tgf β* and *Il1 β* measured by quantitative PCR in CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver samples at indicated time points after CCl₄ injection. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 5$ per group). * $p < 0.05$ (two-tailed t-test).

livers and found a drastic decrease in the total number of immune cells (Fig. 6b) in both groups of mice. In the meantime, we showed that antibody blockade provoked a dramatic abolishment of hepatoprotection in p38 $\alpha^{\Delta H}$ livers through an amplification of necrotic regions (Fig. 6c) associated with a reduced anti-oxidative response (Fig. 6d). Moreover, we also found an accentuation of liver injury in control mice (Fig. 6c), suggesting that these hepatoprotective immune cells were already present in p38-proficient livers (Fig. 6b) but were massively recruited under p38 α deficiency. Interestingly, we found a clear reduction in the level of *Tnf α* and *Tgf β* transcripts (Fig. 6e) in both groups of mice concomitantly upregulated at 40 hours post-CCl₄ challenge after Ccl2/Ccl5 blockade (Fig. 6e,f). These findings indicated that the combination of these two signaling (*Tnf α* and *Tgf β*) participate to the hepatoprotective response. Accordingly, downregulation of *Collagen 1 α 1* level was also observed after Ccl2/Ccl5 blockade (Fig. 6f), confirming the attenuation of liver tissue repair.

Altogether, our data clearly demonstrated the crucial requirement of these two chemotactic signals favoring the recruitment of immune cells to mediate the hepatoprotective response driven by p38 α ablation.

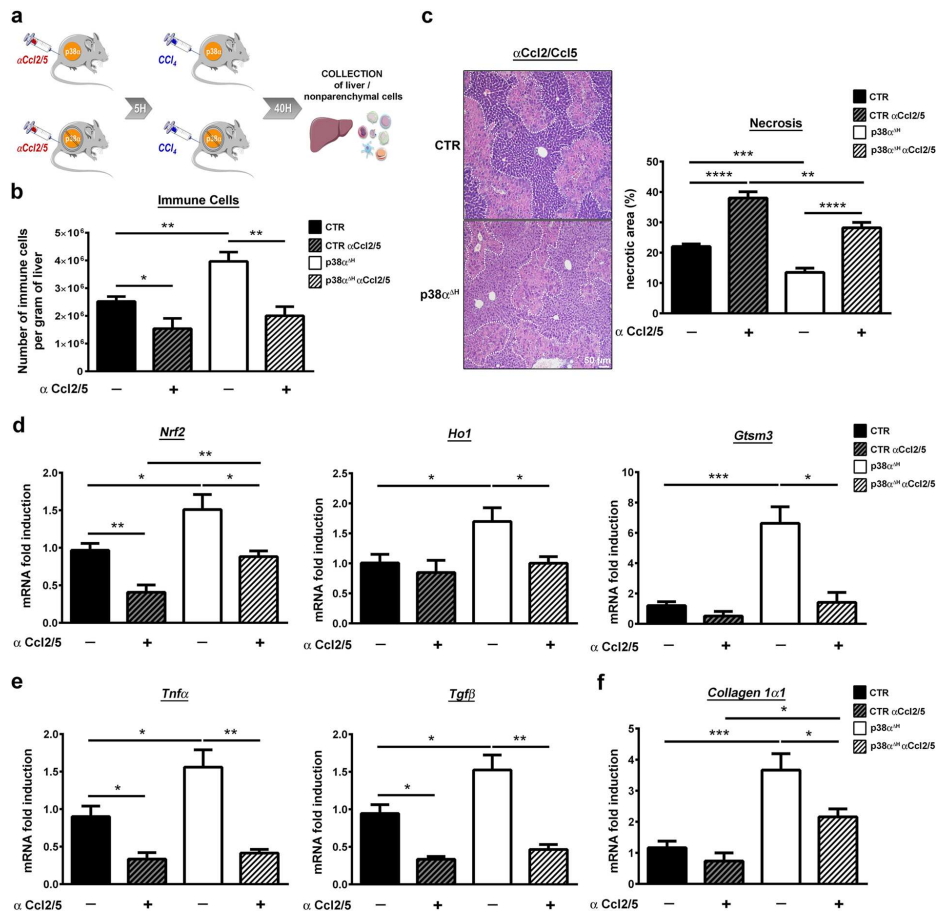


Figure 6. Blockade of Ccl2/Ccl5 chemotactic signals impairs hepatoprotective effect coupled to p38 α deficiency during acute liver injury. (a) Schematic representation of experimental procedure for Ccl2 and Ccl5 blockade. Control (CTR) and p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice were sacrificed at 40 hours after CCl₄ injection. (b) Number of immune cells per gram of liver in CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice treated or not by Ccl2/Ccl5 antibodies, 40 hours after CCl₄ exposure. Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 5$ per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (two-tailed t-test). (c) Necrotic area analysis by liver section H&E staining of CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice treated or not by Ccl2/Ccl5 antibodies and its quantification at 40 hours post-CCl₄. Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 5$ per group). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (two-tailed t-test). (d) Relative mRNA level of antioxidant genes (*Nrf2*, *Ho1* and *Gstm3*) measured by quantitative PCR in CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ livers issued from mice treated or not by Ccl2/Ccl5 antibodies and its quantification at 40 hours post-CCl₄. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 3$ per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (two-tailed t-test). (e,f) Relative mRNA level of *Tnf α* (E) and *Collagen 1 α 1* (F) measured by quantitative PCR in CTR and p38 $\alpha^{\Delta H}$ livers issued from mice treated or not by Ccl2/Ccl5 antibodies and its quantification at 40 hours post-CCl₄. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean \pm SEM ($n \geq 3$ per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (two-tailed t-test).

Discussion

Drug-induced liver injury and acute liver failure (ALF) remains a major problem in Western societies^{45,46}. While significant progress has been made in the understanding of intracellular signaling mechanisms of toxicity related to various compounds in hepatocytes, e.g. paracetamol⁴⁷, there is still an urgent need to develop potent

therapeutic strategies to circumvent ALI and ALF. ALI can be studied in animal models and in isolated hepatocytes and most mechanisms are translatable to humans^{27,48}. Due to its strong ability to integrate a variety of signaling pathways, previous reports highlighted p38 Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) as potential appealing targets to improve ALI outcome. Most of these studies were done by using a hepatospecific ablation of p38 α isoform arising either during foetal (hepatoblasts) or neonatal (immature hepatocytes) development. As p38 α plays a crucial role in cellular differentiation^{18,49,50}, we supposed that earlier deletion could impair differentiation of hepatocytes and terminal liver maturation. In the present study, we developed a new inducible and hepatospecific mice model in which p38 α isoform was completely deleted in mature hepatocytes. Until now, p38 α ablation in the liver was shown as deleterious in different models of liver injury^{22,25,51}. In this study, using the CCl₄ model of acute liver injury, we demonstrate for the first time that p38 α deletion generated a pro-hepatoprotective response against liver injury. Remarkably, we showed that p38 α deficiency after CCl₄ exposure, shaped the inflammatory response to promote efficient tissue repair. Finally, we evidenced that hepatoprotective response driven by p38 α ablation was critically dependent on Ccl2/Ccl5 chemotactic signals, as their blockade dramatically exacerbated liver injury.

Following injuries, p38 α MAPK displayed a wide range of cellular responses to ensure the maintenance of tissue homeostasis. Due to its major role as a negative regulator of cellular proliferation^{20,21,36}, we expected to observe an extensive enhancement of hepatocytes proliferation secondary to p38 α ablation. Differently, we found a lower proliferative response, reflecting buffered injuries (concomitant decrease in necrotic areas and ALT levels) in p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver as compared to control one. Importantly, our data showed that p38 α ablation did not increase the proliferation of hepatocytes after CCl₄ exposure and also revealed that the function of p38 α as a cell cycle checkpoint does not account for the hepatoprotective effect. Our findings are quite novel, since increased proliferation has been until now considered a hallmark of p38 α deficient cells²³.

Interestingly, we demonstrated that the deletion of p38 α isoform in adult hepatocytes has strong repercussions on the immune microenvironment to mediate a potent hepatoprotective response favoring efficient hepatic tissue repair. Indeed, we found a drastic infiltration of immune cells mediated by Ccl2/Ccl5 chemokines. In addition, we clearly identified that Ccl2/Ccl5 chemotactic signals were crucial in that response as their neutralization sensitized to increase liver injury. Therefore, our findings highlight a new aspect in the pleiotropic role of p38 α in hepatocytes during acute liver injury, as until now the beneficial effect of p38 α deletion was strictly observed when performed in immune effectors such as liver myeloid cells or T/NKT cells^{51,52}. Furthermore, the work of Kang and collaborators provided evidence that p38 α ablation in hepatocytes was fueled by a drastic accentuation of liver injury associated with a massive inflammatory cell recruitment⁵¹. This study was conducted using a different model of acute liver injury (e.g. ConA). Collectively, these data underlie that the nature of stimuli-induced injury greatly influences the cellular response of p38 α , as it does not trigger the same immune effectors involving preferentially either myeloid cells (e.g. CCl₄, APAP) or lymphoid T cell reservoir (ConA)⁵³. Therefore, it turns out that depending on the initial stimuli, the flavor of the inflammatory response dictates the outcome of tissue response. Our work clearly strengthens the critical connection between hepatocyte and immune system during acute liver injury and calls into question about the nature of the effectors involved in hepatoprotection. Further experiments are required to elucidate the molecular support of this dialogue. It is noteworthy that we found that the antioxidative response was determinant in the mediation of hepatoprotection in p38 $\alpha^{\Delta H}$ liver. Interestingly, Ccl2/Ccl5 antibody blockade considerably diminished this antioxidative response in our model. These observations are of importance as they illustrated that immune system could behave also as an additional partner to adapt the redox balance during liver injury⁵⁴.

Finally, due to very limited therapeutic options for the treatment of acute liver injury, our work provides another field of treatment targeting specifically p38 α in hepatocyte and manipulating immune response.

Materials and Methods

Generation of conditional knockout mice and animal care. Mice carrying two loxP sites flanking (floxed) exons 2 and 3 of the p38 α gene (p38 $\alpha^{fl/fl}$)³⁰ were interbred with TTR-Cre-Tam mice expressing a tamoxifen-inducible Cre recombinase under the control of the hepatocyte-specific transthyretin promoter³¹ to generate p38 $\alpha^{\Delta H}$ mice (p38 $\alpha^{fl/fl}$ TTR-Cre⁺-Tam) on the C57Bl6J genetic background. In all experiments, littermate carrying the respective loxP-flanked alleles but lacking expression of the Cre recombinase were used as controls (p38 $\alpha^{fl/fl}$ TTR-Cre⁻-Tam). Mice were maintained at a constant temperature and humidity in light-controlled room with a 12 hours light cycle. They had free access to food (SAFE Laboratory) and tap water. To induce specific hepatocyte p38 α deletion, four weeks old male p38 $\alpha^{\Delta H}$ were fed with tamoxifen diet (+1000 mg/kg TAM A115-T7100, Ssniff, Germany) during five days as well as their control littermates (p38 $\alpha^{fl/fl}$ TTR-Cre⁻-Tam). All experiments were conducted in accordance with the institutional guidelines and the recommendations for the care and use of laboratory animals put forward by the Directive 2010/63/EU. This revises Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for scientific purposes. All animal studies were approved by the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) and the Direction Départementale des Services Vétérinaires de Paris (agreement No. 75-956) and by the Mouse Facility Core laboratories (Institut Cochin, Inserm U1016/ CRC UMRS1138).

Acute liver injury model. Experiments were performed both on control (p38 $\alpha^{fl/fl}$ TTR-Cre⁻-Tam) and p38 $\alpha^{\Delta H}$ (p38 $\alpha^{fl/fl}$ TTR-Cre⁺-Tam) male mice between 8 and 10 weeks of age. CCl₄ (Merck, Germany) dissolved with sunflower oil [1:9] was administered intraperitoneally (IP) at 0.56 g/kg of body weight. Two hours before tissue harvest, mice were intraperitoneally injected with 50 mg/kg of Bromodeoxyuridine (BrdU) (Merck, Germany). Mice were euthanized at 0, 12, 24, 40, 48, 60 and 72 hours post-CCl₄. After sacrifice, part of liver tissue was fixed in 4% neutral buffered formalin for immunohistochemistry analysis. The remaining liver tissue was flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until used.

Gene	Forward	Reverse
18S	GTA-ACC-CGT-TGA-ACC-CCA-TT	CCA-TCC-AAT-CGG-TAG-TAG-CG
Catalase	ACA-TGG-TCT-GGG-ACT-TCT-GG	CAA-GTT-TTT-GAT-GCC-CTG-GT
Cd2	TCT-GGG-CCT-GCT-GTT-CAC-A	GGA-TCA-TCT-TGC-TGG-TGA-ATG-A
Cd5	GCT-GCT-TTG-CCT-ACC-TCT-CC	TCG-AGT-GAC-AAA-CAC-GAC-TGC
Collagen 1 α 1	GAG-CGG-AGA-GTA-CTG-GAT-CG	GCT-TCT-TTT-CCT-TGG-GGT-TC
Collagen 3 α 1	GAA-GTC-TCT-GAA-GCT-GAT-GGG	TTG-CCT-TGC-GTG-TTT-GAT-ATT-C
Cyp2e1	CGT-TGC-CTT-GCT-TGT-CTG-GA	AAG-AAA-GGA-ATT-GGG-AAA-GGT-CC
Gstm3	TAT-GAC-ACT-GGG-CTA-TTG-GAA-CAC	GGG-CAT-CCC-CCA-TGA-CA
Ho1	AAG-CCC-AGA-ATG-CTG-AGT-TC	GCC-GTG-TAA-TAT-GGT-ACA-AGG-A
IL1 β	GCC-CAT-CCT-CTG-TGA-CTC-AT	AGG-CCA-CAG-GTA-TTT-TGT-CG
Nrf2	AGG-ACA-TGG-AGC-AAG-TTT-GG	TCT-GTC-AGT-GTG-GCT-TCT-GG
Tg β 1	TGG-CGT-TAC-CTT-GGT-AAC-C	GGT-GCT-GGG-CCC-TTT-CCA-G
Tnfv α	CAT-CTT-CTC-AAA-ATT-CGA-GTG-ACA-A	TGG-GAG-TAG-ACA-AGG-TAC-ACC-CC

Table 1. Primer Sequences.

Antibody depletion experiment. Five hours before CCl₄ treatment, mice received a single IP injection of a cocktail of anti-Ccl2 (clone 2H5, Bio X Cell) antibody at a dose of 7.5 mg/kg and anti-Ccl5 antibody (clone 53405, R&D systems) at a dose of 1.0 mg/kg or control antibody (Polyclonal Armenian Hamster IgG, Bio X Cell; Normal Rat IgG control, R&D Systems). The efficacy of antibody depletion was evaluated 40 hours after CCl₄ treatment.

Serum Transaminase activity. Blood was collected from intracardiac puncture on anesthetized mice during time-course kinetic after CCl₄ treatment and the activity of serum alanine aminotransferase [ALT] was measured using the AU400 chemistry analyzer (Olympus) (Biochemistry Facility, CRI Institute, Paris, France).

Nonparenchymal cell isolation. As previously described⁴⁵, livers were harvested and perfused with Hank's balanced salt solution (1X HBSS) containing 10 mM HEPES, to remove circulating blood cells. The liver was passed through a stainless steel mesh in RPMI 1640 supplemented with 2% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco, ThermoFisher Scientific), 5 mM HEPES, 2 mM Glutamax (Gibco, ThermoFisher Scientific), 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 5×10^{-5} M β -mercaptoethanol (Gibco, ThermoFisher Scientific). The liver cell suspension was collected and parenchymal cells were separated from nonparenchymal cells (NPCs) by centrifugation for 3 min at 800 rpm. The supernatant containing the NPCs was collected and centrifuged for 10 min at 1500 rpm. The pellet was then resuspended in 35% Percoll (GE Healthcare) diluted in RPMI 1640 supplemented with 2% FCS, 20 min at room temperature, at 2,000 rpm. The NPC fraction was collected at the bottom and the cells were collected by two rounds of centrifugation in ice-cold PBS. Red blood cells were removed by incubation with lysis buffer ACK (0.15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ and 0.1 mM Na₂EDTA, pH 7.2). Cells were then washed in RPMI 1640 containing 10% FCS and centrifuged for 10 min at 1,500 rpm. Cells were resuspended in serum-containing medium and viable NPCs were counted by a trypan blue exclusion method, and stored on ice until further use.

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

Western blotting analysis. Total proteins were extracted from snap-frozen livers as described previously⁴⁶. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay (Bio-Rad Protein Assay). Proteins (40 μ g) were resolved by SDS-PAGE and then transferred onto nitrocellulose membranes (0.45- μ m pore size), which were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. Primary antibodies used for western blotting are referenced in Table 2. The proteinbound primary antibodies were detected with an appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (ThermoFisher Scientific). Immunoreactive bands were revealed using the "Clarity Western ECL Substrate" purchased from Bio-Rad. Blots were exposed to Amersham Hyperfilm (GE Healthcare Life Sciences). In all immunoblotting, HSC70 was used to normalize the results. For protein quantification, densitometry analysis was performed using Image J 1.8.0_112. Data are presented as relative units, which represent the densitometric value for the phosphoprotein of interest that was normalized to the total levels of the same protein.

Histology, immunohistochemistry. Tissue was fixed by incubation in 4% formal overnight at 4 °C and embedded in paraffin wax. Hematoxylin/eosin staining was carried out on 5- μ m paraffin sections. For immunohistochemistry, liver sections (5 μ m) were de-paraffinized and incubated in citrate buffer at 95 °C for 20 min for antigen retrieval. Sections were treated with 3% hydrogen peroxide for 15 min at room temperature and then

Antibody	Dilution	Manufacturer and Reference
BrdU	1/400	Thermo Fisher #MA5-12502
Cleaved-Caspase 3	1/100	Cell Signaling #9664
Cyclin A2	1/2000	Abcam #32386
Cyclin B1	1/1000	Cell Signalling #4138
Cyclin D1	1/3000	Pierce MA1-39546
HSC70	1/25000	Santa Cruz #7298
p38 α	1/4000	ThermoFisher Scientific #PA5-17713
PHH3	1/500	Millipore #06-570
phospho-p38	1/4000	Cell Signalling #4511

Table 2. Antibodies used in immunohistochemistry or western blot experiments.

incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies referenced in Table 2. After three washes in PBS1X, tissue sections were incubated with biotinylated anti-mouse/rabbit or rat IgG (1/200 dilution, Vector Laboratories, CA, USA) for 1 hr at RT and then washed three times in PBS1X, after which streptavidin–horseradish peroxidase conjugates (Vector Laboratories, CA, USA) were added and the slides incubated for 45 min. After three washes with PBS1X, DAB solution (Vector Laboratories, CA, USA) was added and the slides were counterstained with haematoxylin.

In situ detection of ROS. Fresh cross sections (8 μm) of unfixed, frozen mouse livers were immediately incubated with 5 μM DHE at 37 °C for 30 minutes in a humidified chamber, subsequently washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline, and coverslipped³⁷. The fluorescence intensity of DHE staining was measured with ImageJ software.

Image acquisition and analysis. Concerning HE, BrdU and PHH3 labelling, images were taken using a Nikon Statif Eclipse E600 microscope with x10 and x20 magnification, 1.4–0.7 NA PL-APO objectives, a DXM1200 cooled CCD camera (Nikon), and ACT-1 (version 2.63; Universal Imaging). For cleaved-caspase 3 labelling, images were taken using an Olympus BX63F, at 4x magnification Uplan FLN objective, an Olympus DP73 camera and Metamorph software. Necrotic area were quantified by morphometric analysis using an open-source ImageJ software in 5 fields at x10 magnification. For BrdU/PHH3 staining, 4000 hepatocytes (for each liver sample analyzed) were counted; at least 10 areas of 33,500 μm^2 were analyzed. Cleaved-caspase 3 immunostaining was quantified by color segmentation using an open-source ImageJ software in 5 fields at 4x magnification. Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Software) was used for figure construction.

Statistical analysis. Statistical significance was determined with a 2-tailed Student's t test performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc). All data are representative of 3 to 10 animals of each genotype and are expressed as mean \pm SEM. A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

References

- Bernal, W. & Wendon, J. Acute Liver Failure. *New England Journal of Medicine* **369**, 2525–2534 (2013).
- Björnsson, E. S., Bergmann, O. M., Björnsson, H. K., Kvaran, R. B. & Olafsson, S. Incidence, Presentation, and Outcomes in Patients With Drug-Induced Liver Injury in the General Population of Iceland. *Gastroenterology* **144**, 1419–1425.e3 (2013).
- Franco, E. Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries. *World Journal of Hepatology* **4**, 68 (2012).
- Ingawale, D. K., Mandlik, S. K. & Naik, S. R. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): A critical discussion. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **37**, 118–133 (2014).
- Rutherford, A. & Chung, R. Acute Liver Failure: Mechanisms of Hepatocyte Injury and Regeneration. *Seminars in Liver Disease* **28**, 167–174 (2008).
- Bantel, H. & Schulze-Osthoff, K. Mechanisms of Cell Death in Acute Liver Failure. *Frontiers in Physiology* **3** (2012).
- Diehl, A. M. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol. Rev.* **174**, 160–171 (2000).
- Jaeschke, H., Williams, C. D., Ramachandran, A. & Bajt, M. L. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity: Acetaminophen hepatotoxicity and repair. *Liver International* **32**, 8–20 (2012).
- Kaplowitz, N. Mechanisms of liver cell injury. *J. Hepatol.* **32**, 39–47 (2000).
- Cordero-Espinoza, L. & Huch, M. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* **128**, 85–96 (2018).
- Malhi, H. & Gores, G. J. Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury. *Gastroenterology* **134**, 1641–1654 (2008).
- Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37–40 (2001).
- Cuenda, A. & Rousseau, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1358–75 (2007).
- Nebreda, A. R. & Porras, A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 257–260 (2000).
- Raman, M., Chen, W. & Cobb, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**, 3100–3112 (2007).
- Adams, R. H. *et al.* Essential role of p38 α MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol. Cell* **6**, 109–116 (2000).
- Mudgett, J. S. *et al.* Essential role for p38 α mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 10454–10459 (2000).
- Tamura, K. *et al.* Requirement for p38 α in Erythropoietin Expression. *Cell* **102**, 221–231 (2000).
- Campbell, J. S., Argast, G. M., Yuen, S. Y., Hayes, B. & Fausto, N. Inactivation of p38 MAPK during liver regeneration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **43**, 180–188 (2011).

20. Hui, L. *et al.* p38 α suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nature Genetics* **39**, 741–749 (2007).
21. Stepniak, E. c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. *Genes & Development* **20**, 2306–2314 (2006).
22. Tormos, A. M. *et al.* Liver-specific p38 α deficiency causes reduced cell growth and cytokinesis failure during chronic biliary cirrhosis in mice. *Hepatology* **57**, 1950–1961 (2013).
23. Hui, L., Bakiri, L., Stepniak, E. & Wagner, E. F. p38 α : A Suppressor of Cell Proliferation and Tumorigenesis. *Cell Cycle* **6**, 2429–2433 (2007).
24. Sakurai, T. *et al.* p38 Inhibits Liver Fibrogenesis and Consequent Hepatocarcinogenesis by Curtailing Accumulation of Reactive Oxygen Species. *Cancer Research* **73**, 215–224 (2013).
25. Sakurai, T. *et al.* Hepatocyte Necrosis Induced by Oxidative Stress and IL-1 α Release Mediate Carcinogen-Induced Compensatory Proliferation and Liver Tumorigenesis. *Cancer Cell* **14**, 156–165 (2008).
26. Liedtke, C. *et al.* Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis & Tissue Repair* **6**, 19 (2013).
27. Maes, M., Vinken, M. & Jaeschke, H. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. *Toxicology and Applied Pharmacology* **290**, 86–97 (2016).
28. Martinez, M., Mourelle, M. & Muriel, P. Protective effect of colchicine on acute liver damage induced by CCl₄. Role of cytochrome P-450. *J Appl Toxicol* **15**, 49–52 (1995).
29. Recknagel, R. O., Glende, E. A., Dolak, J. A. & Waller, R. L. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol. Ther.* **43**, 139–154 (1989).
30. Heinrichsdorff, J., Luedde, T., Perdiguer, E., Nebreda, A. R. & Pasparakis, M. p38 α MAPK inhibits JNK activation and collaborates with I κ B kinase 2 to prevent endotoxin-induced liver failure. *EMBO reports* **9**, 1048–1054 (2008).
31. Tannour-Louet, M. A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. *Hepatology* **35**, 1072–1081 (2002).
32. Knockaert, L. *et al.* Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. *Laboratory Investigation* **92**, 396–410 (2012).
33. Tierney, D. J., Haas, A. L. & Koop, D. R. Degradation of cytochrome P450 2E1: selective loss after labilization of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 9–16 (1992).
34. Ambrosino, C. & Nebreda, A. R. Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biol Cell* **93**, 47–51 (2001).
35. Lee, K., Kenny, A. E. & Rieder, C. L. P38 Mitogen-activated Protein Kinase Activity Is Required during Mitosis for Timely Satisfaction of the Mitotic Checkpoint But Not for the Fidelity of Chromosome Segregation. *Molecular Biology of the Cell* **21**, 2150–2160 (2010).
36. Thornton, T. M. & Rincon, M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int. J. Biol. Sci.* **5**, 44–51 (2009).
37. Wong, E. S. M. *et al.* p38MAPK Controls Expression of Multiple Cell Cycle Inhibitors and Islet Proliferation with Advancing Age. *Developmental Cell* **17**, 142–149 (2009).
38. Cichoż-Lach, H. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology* **20**, 8082 (2014).
39. Weber, L. W. D., Boll, M. & Stampfl, A. Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. *Critical Reviews in Toxicology* **33**, 105–136 (2003).
40. Tormos, A. M., Taléns-Visconti, R., Nebreda, A. R. & Sastre, J. p38 MAPK: A dual role in hepatocyte proliferation through reactive oxygen species. *Free Radical Research* **47**, 905–916 (2013).
41. Cai, Z. *et al.* N-acetylcysteine protects against liver injury induced by carbon tetrachloride via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 8655–8662 (2015).
42. Jadeja, R. N., Upadhyay, K. K., Devkar, R. V. & Khurana, S. Naturally Occurring Nrf2 Activators: Potential in Treatment of Liver Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, 1–13 (2016).
43. Xu, W. *et al.* The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis. *Laboratory Investigation* **88**, 1068–1078 (2008).
44. Karlmark, K. R., Wasmuth, H. E., Trautwein, C. & Tacke, F. Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* **2**, 233–242 (2008).
45. Bernal, W., Lee, W. M., Wendon, J., Larsen, F. S. & Williams, R. Acute liver failure: A curable disease by 2024? *Journal of Hepatology* **62**, S112–S120 (2015).
46. Lee, W. M. Drug-induced Acute Liver Failure. *Clinics in Liver Disease* **17**, 575–586 (2013).
47. Ye, H., Nelson, L. J., Moral, M. G., del, Martínez-Naves, E. & Cubero, F. J. Dissecting the molecular pathophysiology of drug-induced liver injury. *World Journal of Gastroenterology* **24**, 1373–1385 (2018).
48. Jaeschke, H., Xie, Y. & McGill, M. R. Acetaminophen-induced Liver Injury: from Animal Models to Humans. *J Clin Transl Hepatol* **2**, 153–161 (2014).
49. Segalés, J., Perdiguer, E. & Muñoz-Cánoves, P. Regulation of Muscle Stem Cell Functions: A Focus on the p38 MAPK Signaling Pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **4** (2016).
50. Séverin, S., Ghevaert, C. & Mazharian, A. The mitogen-activated protein kinase signaling pathways: role in megakaryocyte differentiation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **8**, 17–26 (2010).
51. Kang, Y. J., Bang, B.-R., Otsuka, M. & Otsu, K. Tissue-Specific Regulation of p38 α -Mediated Inflammation in Con A-Induced Acute Liver Damage. *J. Immunol.* **194**, 4759–4766 (2015).
52. Liu, J. *et al.* Deficiency of p38 α in macrophage ameliorates D-galactosamine/TNF- α -induced acute liver injury in mice. *The FEBS Journal* **284**, 4200–4215 (2017).
53. Khan, H. A., Ahmad, M. Z., Khan, J. A. & Arshad, M. I. Crosstalk of liver immune cells and cell death mechanisms in different murine models of liver injury and its clinical relevance. *HBPD INT* **16**, 245–256 (2017).
54. Li, S., Hong, M., Tan, H.-Y., Wang, N. & Feng, Y. Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, 1–21 (2016).
55. L’Hermitte, A. *et al.* Lect2 controls inflammatory monocytes to constrain the growth and progression of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, <https://doi.org/10.1002/hep.30140> (2018).
56. Celson-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D., Margall-Ducos, G. & Desdouets, C. The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. *J Clin Invest* **119**, 1880–7 (2009).
57. Gentric, G. *et al.* Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* **125**, 981–92 (2015).

Acknowledgements

We thank Manolis Pasparakis for giving us the mice p38 α ^{fl/fl}. We thank the core facilities of the Institut Cochin, INSERM U1016 UMR CNRS 8104, Université Paris Descartes. We gratefully acknowledge the Centre d’Explorations Fonctionnelles staff for their technical assistance with mice. Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, F75006 Paris, France.

This work was supported by a grant from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). M.F. was supported by a fellowship from Ecole Doctorale BioSPC, Université Paris Descartes and the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20170437207).

Author Contributions

M.F.: design, acquisition of all data, analysis and interpretation of all data, drafting of manuscript. M.C.: design, acquisition of data, analysis and interpretation of data (immune part of the study), critical reading of the manuscript. N.B.: performed experiments and technical support. S.P.: performed experiments (immune part of the study). R.D.: performed experiments and technical support. J.P.C.: study concept and experiments design (immune part of the study), critical reading of the manuscript. C.D.: study concept, funding and critical reading of the manuscript. S.C.M.: study concept, study supervision, planned the experiments, interpreted data, designed the figures and wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51175-z>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019



Polyploidy in liver development, homeostasis and disease

Romain Donne^{1,2}, Maëva Saroul-Ainama^{1,2}, Pierre Cordier^{1,2}, Séverine Celton-Morizur¹ and Chantal Desdouets¹

Abstract | Ploidy (or whole-genome duplication) is the condition of having more than two basic sets of chromosomes. Ploidy is well tolerated in many species and can lead to specific biological functions. In mammals, programmed ploidy takes place during development in certain tissues, such as the heart and placenta, and is considered a feature of differentiation. However, unscheduled ploidy can cause genomic instability and has been observed in pathological conditions, such as cancer. Ploidy of the liver parenchyma was first described more than 100 years ago. The liver is one of the few mammalian organs that display changes in ploidy during homeostasis, regeneration and in response to damage. In the human liver, approximately 30% of hepatocytes are polyploid. The ploidy of hepatocytes results from both nuclear ploidy (an increase in the amount of DNA per nucleus) and cellular ploidy (an increase in the number of nuclei per cell). In this Review, we discuss the regulation of ploidy in liver development and pathophysiology. We also provide an overview of current knowledge about the mechanisms of hepatocyte ploidy, its biological importance and the fate of polyploid hepatocytes during liver tumorigenesis.

The chromosome houses the genetic information specific to all living beings. Each species has a specific number, n , of chromosomes in its haploid genome. Thus, *Homo sapiens* cells have 23 chromosomes and *Mus musculus* cells have 20 chromosomes in their haploid genome¹. Eukaryotic organisms typically have two complete sets of homologous chromosomes. However, the number of a set of chromosomes can differ between cells or species. Cells with only one copy of each chromosome are described as haploid (n), those with two copies are diploid ($2n$), with three copies are triploid ($3n$), with four copies are tetraploid ($4n$) and so on (FIG. 1a). The presence of more than two complete sets of chromosomes is known as ploidy or whole-genome duplication². The polyploid state should not be confused with aneuploidy, in which the copy number of whole chromosomes or chromosome segments is modified, by either a gain or a loss³. In polyploid species, the additional chromosome sets can have different origins. Allopolyploidy arises through the fusion of two or more cells with distantly related genomes (that is, from different species). Autopolyploidy arises through the duplication of a single genome or the fusion of closely related genomes (that is, from the same species). Finally, the number of chromosome sets can be amplified within a single nucleus (mononucleate polyploid populations), defining the nuclear ploidy, or, as in some polyploid cells, the genetic

material can be distributed between two or more nuclei, defining the cellular ploidy (FIG. 1b).

Ploidy is not rare in eukaryotes, and is now considered a common mode of speciation, with consequences for evolution and biodiversity⁴⁻⁷. Indeed, ploidy is a feature of plant genomes, contributing to variations in both genome size and gene content⁸⁻¹⁰. Ploidy has been observed in most plant groups, but is most frequent in angiosperms¹¹⁻¹³. It has also been reported in some insects, fishes, amphibians and reptiles^{7,14}. In mammals, whole-organism ploidy is rare, as it typically leads to embryonic resorption or spontaneous abortion¹⁵⁻¹⁷. However, the red viscacha rat (*Tympanoctomys barrerae*) and its close relatives, which are fully tetraploid, are the exception to the rule¹⁸. The emergence of polyploid cells in mammals can be associated with the development and differentiation of certain tissues. For instance, polyploid cells are present in the heart (cardiomyocytes: $4n$), placenta (trophoblast giant cells: $8n$ to $64n$), bone marrow (megakaryocytes: $16n$ to $128n$), pancreas (acinar cells: $4n$)^{19,20} and liver (hepatocytes: $4n$ to $8n$)²¹⁻²³. Over the past decade, several breakthroughs have occurred in determining the role of ploidy in regulating organ size, tissue regeneration and repair^{24,25}. In *Drosophila melanogaster* and some vertebrate tissues, ploidy provides an alternative means of compensating for cell loss, particularly in postmitotic

¹Team Proliferation, Stress and Liver Physiopathology, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université de Paris, Paris, France.

²These authors contributed equally: Romain Donne, Maëva Saroul-Ainama, Pierre Cordier.

✉e-mail: chantal.desdouets@inserm.fr

<https://doi.org/10.1038/s41575-020-0284-x>

REVIEWS

Key points

- Polyploidy, a condition in which cells contain more than two sets of homologous chromosomes, is a well-known feature of mammalian hepatocytes.
- Polyploidy is defined on the basis of the DNA content of each nucleus (nuclear ploidy; for example, $2n$, $4n$ or $8n$) and the number of nuclei per cell (cellular ploidy).
- The adult liver contains a heterogeneous mixture of diploid and polyploid hepatocytes.
- The liver is one of the few mammalian organs that display changes in ploidy during normal homeostasis, during regeneration and in response to damage.
- The polyploid state could provide protection from tumorigenesis by providing extra copies of tumour suppressor genes.
- Amplification of nuclear ploidy within liver tumours is associated with a poor prognosis.

tissues that lack stem cells²⁵. For example, polyploidy has a crucial role in heart and kidney regeneration and repair processes in mammals^{25–28}. One major concern is the association of an accumulation of polyploid contingents with many age-related diseases, including arterial hypertension, hyperthyroidism, metabolic disorders and cancer^{29–33}. Proliferating polyploid cells have been shown genetically unstable, thereby potentially facilitating tumour development^{21,34}. In addition, there is growing evidence to suggest that polyploid intermediates play a key part in shaping the composition of cancer genomes: most solid tumours have polyploid or near-polyploid karyotypes^{35,36}.

Thus, several key questions arise. Does polyploidy confer selective benefits and a protective role in evolution, or does it generate a key contingent of cells that underlie tumorigenesis? This Review focuses on the duality of the polyploid state, and on the mechanisms leading to it. First, we introduce the different

mechanisms leading to polyploidy. Next, we examine how polyploid hepatocytes are generated during physiological and pathological situations. Finally, we discuss the effects of polyploidy on liver function.

Mechanisms leading to polyploidy

How does a diploid cell become polyploid? In a physiological or pathological context, various mechanisms can promote the genesis of polyploid cells: endoreplication, cytokinesis failure and cell fusion, which is not dependent on the cell cycle and division (FIG. 2).

Cell fusion. Fusion can occur between cells of the same type (homotypic) or cells of different origins (heterotypic) (FIG. 2a). Cells that fuse without nuclear fusion are described as syncytia. The major cell fusion event that modifies ploidy is fertilization (an example of heterotypic cell fusion)³⁷. Cell fusion is also a key process in tissue development and homeostasis. For example, myoblasts fuse to form myotubes in muscle, macrophages fuse to form osteoclasts in bone and cytotrophoblasts fuse to form placental syncytiotrophoblasts^{38–40}. Cell fusion mechanisms have been analysed in detail in several experimental models, in particular in myoblast differentiation⁴¹. Cell fusion requires cell–cell adhesion via the repulsive charges of the two cells' membranes, followed by destabilization of the opposing lipid bilayers, leading to fusion, pore formation and expansion. Myoblasts use actin-propelled membrane protrusions to promote fusogenic protein engagement and fusion pore formation⁴². Cell fusion also has a key role in wound healing and tissue regeneration. In injured tissues, bone marrow-derived cells can fuse to differentiated cells to form hybrids with regenerative potential⁴³. Such heterotypic cell fusion has been observed in various human and mice organs, including the muscle, brain, retina, intestine and liver, and has been shown to participate in the re-establishment of tissue function^{44–48}.

Viral infections can also have an important role in the formation of polyploid cells⁴⁹. The best-documented example is that of human papillomavirus (HPV), the major aetiological agent of cervical cancer⁵⁰. The expression of the viral HPV-16 E5 oncoprotein at the surface of infected cervical epithelial cells is sufficient for the formation of tetraploid binucleate cells^{51,52}. Tetraploid cervical cells are observed in pre-malignant lesions of human cervical cancer, which has been established as a prognostic factor that enables estimation of the relative risk of progression into more advanced lesions⁵³. Interestingly, women diagnosed as low-grade squamous intraepithelial lesion/HPV-positive exhibit elevated levels of tetraploid cervical cells compared with normal/HPV-negative women, indicating that formation of tetraploid cells is clearly associated with HPV infection⁵⁴.

Endoreplication. The canonical cell cycle of mammals has four successive phases: G1, S, G2 and M (FIG. 2b). This process is governed by cyclin-dependent kinases (CDKs), a family of serine–threonine protein kinases. CDK activity is dependent on association with non-catalytic regulatory subunits called cyclins. CDK–cyclin complexes phosphorylate specific substrates to induce DNA

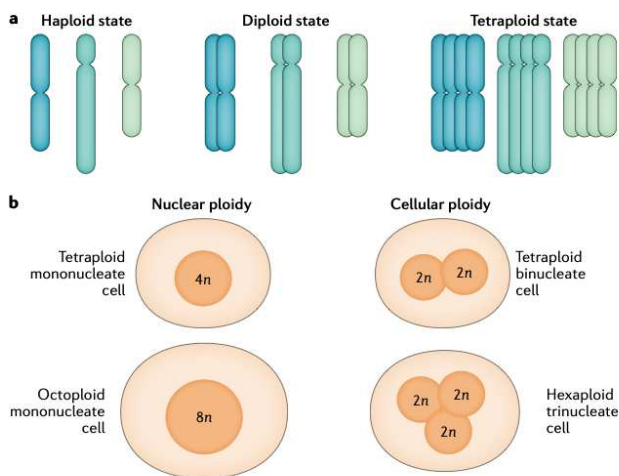


Fig. 1 | Characteristics of polyploidy. a | Ploidy is the number of complete sets of chromosomes in a cell. Somatic individual organisms, tissues and cells can be described according to the number of sets of chromosomes present: haploid (one set), diploid (two sets) and tetraploid (four sets). **b** | Polyploidy is defined on the basis of the DNA content of each nucleus, which is called nuclear ploidy (for example, a cell can be tetraploid mononucleate ($4n$) or octoploid mononucleate ($8n$)), and on the number of nuclei per cell, which is called cellular ploidy (for example, a cell can be tetraploid binucleate ($2 \times 2n$) or hexaploid trinucleate ($3 \times 2n$)). n , chromosome number.

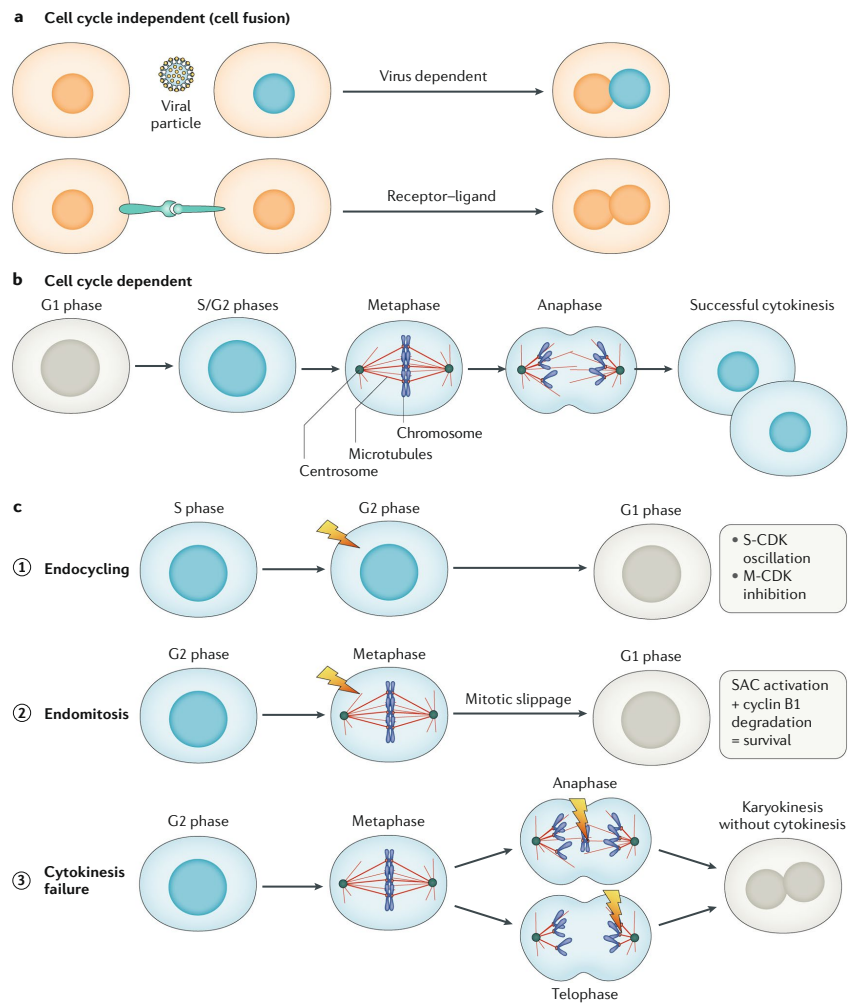


Fig. 2 | Molecular mechanisms that lead to the polyploid state. Polyploid cells can be generated through various mechanisms that are classified according to their dependence on the cell cycle. **a** | The only cell cycle-independent process that leads to polyploid cells is cell fusion, which can occur during virus-mediated infections or through receptor–ligand interactions, giving rise to binucleate or multinucleated cells. **b** | Another mechanism relies on modifications of the canonical eukaryotic cell cycle that arise either during interphase (G1, S and G2 phases) or mitosis (prophase, metaphase, anaphase and telophase). **c** | Endoreplication encompasses both endocycling and endomitosis. (1) Endocycling comprises alternating G and S phases, which eventually results in a rise in nuclear ploidy. This aberrant cell cycle is achieved by the combination of S phase cyclin-dependent kinase (S-CDK) oscillation and mitotic entry impediment, either through cyclin B proteolysis or M phase cyclin-dependent kinase (M-CDK) inhibition. (2) Endomitosis stems from issues that arise during mitosis. For instance, prolonged spindle assembly checkpoint (SAC) activation in metaphase resulting from a non-amphitelic chromosome attachment can be accompanied by progressive cyclin B1 degradation. This process, known as mitotic slippage, allows the cell to escape mitosis and reach the G1 phase. (3) Finally, cytokinesis failure can result in the genesis of binucleate cells by preventing the physical separation of the cytoplasm (through cytokinesis) in telophase. Cytokinesis failure can be induced as a result of any interferences emerging during the highly regulated process of cytokinesis. Lightning bolts indicate the location of cell cycle anomalies, such as lagging chromosomes or cytoskeleton disorganization.

REVIEWS

replication (which is driven by the CDK responsible for S phase entry, S-CDK) and mitosis (which is driven by the CDK responsible for M phase entry, M-CDK), the two major events of the cell division cycle⁵⁵. In mammals, the S and M phases are controlled by CDK2 associated with cyclins E and A, and by CDK1 associated with cyclins B and A, respectively. These two steps are coupled, such that the M phase cannot begin until the S phase has been completed. Endoreplication is an alternative cell cycle in which cells successively replicate their genomes in the absence of cell division^{56–59}. This process leads to the genesis of mononucleate polyploid progenies. There are two variants of the endoreplication process: endocycles and endomitosis (FIG. 2c). During endocycles, cells alternate between the G and S phases, whereas during endomitosis, cells abort mitosis by skipping metaphase, anaphase or cytokinesis⁵⁶. Several elegant reviews have highlighted the mechanisms that regulate endocycles in different species and cell types^{55,57,60}. The key event that triggers endocycles is the inhibition of entry into mitosis. This inhibition might be mediated by the proteolysis of mitotic cyclins under the control of an E3 ubiquitin ligase, the APC/C (anaphase-promoting complex; also known as the cyclosome). M-CDK can also be inhibited by interactions with cyclin kinase inhibitors. A second crucial event is the oscillation of S-CDK activity between low and high levels in the G and S phases, respectively, which is essential for genome reduplication in the absence of cell division. One of the best-characterized examples of an endocycle in mammals is observed in the trophoblast giant cells. Trophoblast giant cell polyploidization is crucial for implantation and for the modulation of post-implantation placentation⁶¹. In particular, accumulation of the cyclin kinase inhibitors p57 and p21 is essential for endocycle induction, as it enhances cyclin B degradation and inhibits CDK1 activity^{62,63}. Also, E2F transcription factors are required for the regulation of trophoblast giant cell polyploidization^{64,65}. This point is discussed in more detail later.

The observation in different experimental models of a connection between genome instability and endoreplication cycles is a major source of concern^{57,66}. For instance, double-strand break induction is common in the leaves of *Arabidopsis thaliana* plants subjected to ultraviolet irradiation. Induction of the DNA damage response results in G2–M arrest. If the DNA damage response persists, endoreplication is triggered^{67,68}. In this context, it has been suggested that endoreplication is a strategy used by the plant to sustain growth under genotoxic stress. In human and mouse cell lines that have high amounts of dysfunctional telomeres, endoreplication is induced by p53/pRb (REFS^{69,70}). This endoreplication requires persistent serine-protein kinase ATM and/or ATR (ATM and RAD3-related)-dependent signalling, which is induced by irreparably damaged telomeres. Prolonged cell cycle arrest in the G2 phase leads to mitosis being bypassed, which results in the genesis of mononucleate tetraploid progenies^{69,70}.

Endomitosis has been linked to problems in metaphase–anaphase transition. Thus, cancer cells treated with antimetabolic drugs that target microtubule dynamics (for example, taxanes, vinca alkaloids and epothilones)

are blocked in metaphase owing to spindle assembly checkpoint activation⁷¹. The spindle assembly checkpoint prevents passage through anaphase until all chromosomes are properly attached to kinetochores⁷². Sustained spindle assembly checkpoint activation results in either cell death through a phenomenon called mitotic catastrophe (leading to cancer remission) or mitosis exit in metaphase, also known as mitotic slippage, driving cancer progression^{73–75}. The outcome is dictated by the balance between the opposing activities of the apoptotic machinery and two mitotic ubiquitin ligases. Slippage is thought to involve the gradual proteolysis of cyclin B1 by the APC/C and CRL2^{ZYG11A/B} ubiquitin ligases^{76–78}. How cancer cells treated with spindle poisons (such as taxol) avoid apoptosis during mitosis remains unclear. It has been suggested that polyploidy might confer a survival advantage on tumour cells, contributing to the evolution of treatment resistance⁷⁹. Mitotic slippage events have also been described during colorectal cancer cell divisions in tumours with *adenomatous polyposis coli* (*APC*) gene mutations⁸⁰. *APC* mutations are the most frequent type of mutation in human colorectal tumours⁸¹. *APC* is involved in the WNT signalling pathway, but it also binds to mitotic spindle microtubules, and its absence impairs kinetochore–microtubule interactions, leading to chromosomal instability in *APC*-driven murine colon carcinomas⁸². Dikovskaya et al. have demonstrated that conditional knockout of *APC* in vitro and in vivo induces mitotic slippage that is linked to the genesis of a mononucleate tetraploid cell contingent⁸⁰. However, the link between tetraploid cells with *APC* mutations and the increase in chromosomal instability in colon carcinogenesis remains unclear.

Cytokinesis failure. Cytokinesis is the final step in cell division and is initiated during anaphase⁸³. It involves a finely regulated series of events to ensure that genomic and cytoplasmic materials are evenly distributed between the two nascent daughter cells. Four events must occur for the correct induction of cytokinesis: establishment of the division plane, contraction of the actomyosin ring, ingression of the cleavage furrow and, finally, formation of the intracellular bridge, the degradation of which leads to cell abscission. Interference with the progression of these steps can lead to cytokinesis failure and to the genesis of binucleate polyploid cells^{84,85} (FIG. 2c). Cytokinesis failure has been known for several decades to be a physiological process involved in the development of certain human tissues and organs, such as the heart⁸⁶, bone marrow⁸⁷ and liver⁸⁸. For example, ventricular cardiomyocytes respond to the increase in blood flow after birth with an adaptive increase in volume (known as hypertrophy)⁸⁹. This transition from hyperplasia to hypertrophy is clearly associated with polyploidization as it leads to the genesis of binucleate tetraploid cardiomyocytes⁹⁰. The degree of polyploidization in ventricular cardiomyocytes differs between species and varies with age, but it might reach 85% in rodents and 30% in humans^{90–93}. Cyclin G1 has been identified as an important player in the molecular machinery that controls cardiomyocyte binucleation. The expression of cyclin G1 in neonatal cardiomyocytes

promotes G1-S cell cycle transition but inhibits cytokinesis⁹⁴. Cytokinesis failure in cardiomyocytes might also be caused by the abnormal localization of proteins that regulate the organization of the contractile ring (for example, Ras homologue gene family member A (RhoA), ROCK-I, ROCK-II and anillin)^{95,95,96}.

Cytokinesis failure has also been reported in numerous diseases, often in association with high rates of mutation or genomic instability^{97–99}. In their elegant review, Lacroix and Maddox describe several examples of cytokinesis failure events in different diseases: Wiskott–Aldrich syndrome, X-linked neutropenia, Fanconi anaemia, Lowe syndrome, type II neurofibromatosis and age-related macular degeneration¹⁰⁰. Interestingly, bulk chromatin, or even a single lagging chromosome trapped in the cleavage furrow, can induce cytokinesis failure and tetraploidization in human cells^{101,102}. Cytokinesis defects have also been reported in many different types of cancer cells (such as breast, colon and ovarian cells), as a result, for example, of dysfunctions of various proteins that control the cytokinesis process (aurora A, mitotic arrest-deficient 2 (MAD2) and large tumour suppressor 1 (LATS1))²¹.

Polyploidy in the liver

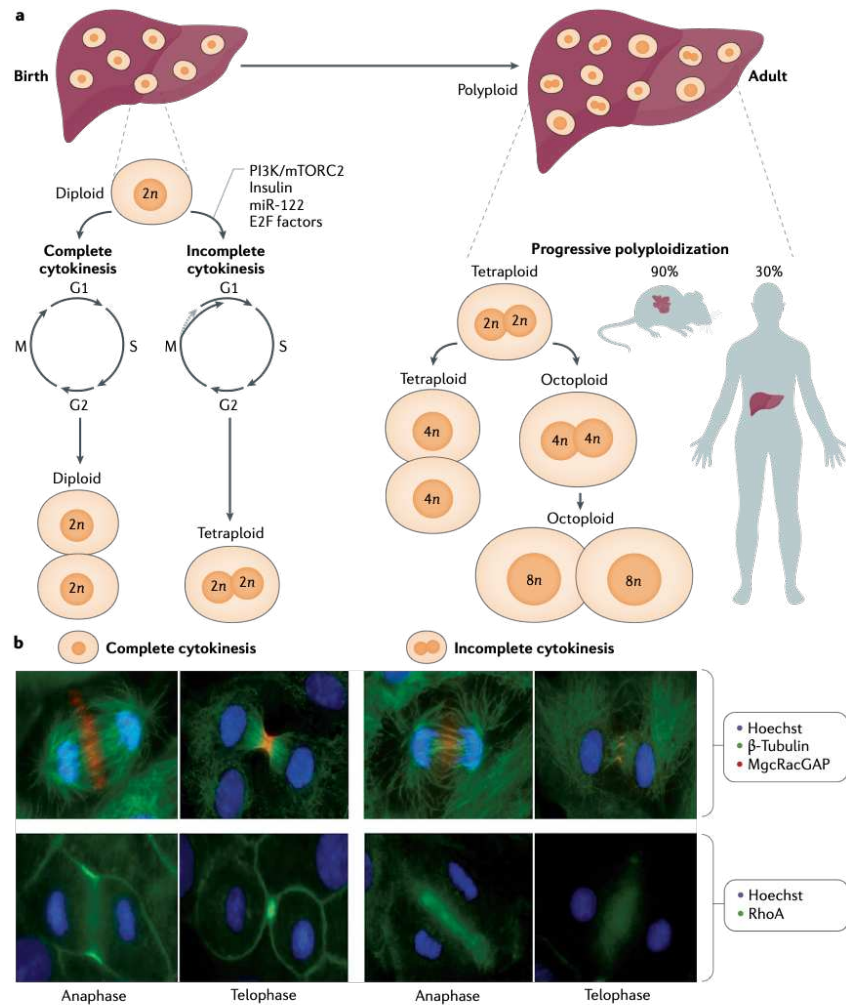
The liver is a vital organ with an extraordinary range of physiological functions, including the metabolism of carbohydrates, lipids and amino acids, detoxification of xenobiotic compounds, synthesis of serum proteins, and bile production and secretion. These functions are performed primarily by hepatocytes, which account for 70% of the cells in the human liver¹⁰³. Interestingly, the metabolic functions of hepatocytes are specific to their position along the portocentral axis, making it possible to distinguish between 'periportal' hepatocytes (which are involved in gluconeogenesis, ureagenesis, β -oxidation of fatty acids, amino acid breakdown and cholesterol biosynthesis) and 'pericentral' hepatocytes (which are involved in glycolysis, de novo lipogenesis and alcohol detoxification)^{104–108}. Another source of hepatocyte heterogeneity is differences in ploidy. At birth, all hepatocytes are diploid, with a single nucleus containing two copies of each chromosome^{109,110}. During postnatal growth, the liver parenchyma undergoes cellular changes characterized by gradual polyploidization, leading to the emergence of hepatocytes of several different ploidy classes^{109,110} (FIG. 3). Hepatocyte ploidy depends on the DNA content of each nucleus (nuclear ploidy: diploid, tetraploid, octoploid and so on) and on the number of nuclei per hepatocyte (cellular ploidy: mononucleate, binucleate)^{109,110}. For example, polyploid hepatocytes can be tetraploid (either binucleate with two diploid (2*n*) nuclei or mononucleate with a single tetraploid (4*n*) nucleus) or octoploid (either binucleate with two tetraploid (4*n*) nuclei or mononucleate with a single octoploid (8*n*) nucleus). The liver has long been known to display polyploidy, and various studies have determined the proportions of polyploid hepatocytes in the liver parenchyma of different species^{111–115}. For example, up to 90% of adult hepatocytes are polyploid in rodents^{88,116–118}, versus approximately 30% in humans^{119–123}. An increase in cell size is the most obvious

and consistent consequence of an increase in ploidy. Several studies have shown that a doubling of chromosome number approximately doubles the size of hepatocytes in humans and mice parenchyma^{124–127}. There is no substantial difference in the volume of a given state of ploidy, for example, between a tetraploid contingent of diploid binucleate cells (2 × 2*n*) and a tetraploid contingent of tetraploid mononucleate cells with a single tetraploid (4*n*) nucleus^{126,128}. Intriguingly, when the volume of the cell increases twofold during polyploidization, the surface area of cellular structures increases only 1.4-fold (in yeast and mammalian cells)⁹⁸. In addition, as already demonstrated in *A. thaliana*¹²⁹, changes in the proportions of cellular elements upon polyploidization modify chromosome dynamics and could influence the structure of the nucleus.

Polyploidy in liver development

Polyploidization during development has been analysed almost exclusively in rodent models. All hepatocytes in the newborn rodent liver are diploid and have high rates of proliferation¹³⁰. However, cell division gradually declines in rodents, such that, by 6 weeks of age, DNA synthesis is detected in only a few hepatocytes, at rates similar to those reported for the normal adult liver^{88,131}. Various in vivo studies have shown that polyploidization begins in the first few weeks after birth with the genesis of binucleate tetraploid hepatocytes (2 × 2*n*)^{88,118,132–134}. During this period, diploid hepatocytes (2*n*) follow either a normal cell cycle or an adapted cell cycle with karyokinesis but no cytokinesis (cytokinesis failure; FIG. 3). Proliferating binucleate tetraploid hepatocytes can then repeat DNA replication, leading either to cytokinesis, which generates two mononucleate tetraploid hepatocytes (4*n*), or to another failure of cytokinesis, which generates a binucleate octoploid hepatocyte (2 × 4*n*)⁸⁸ (FIG. 3). This situation results in the establishment of physiological polyploidy. Margall-Ducos et al. showed that the canonical cytokinesis programme is disrupted owing to the absence of actinomyosin ring formation¹³³. Indeed, the organization of the actin cytoskeleton during the anaphase–telophase transition is impaired in these conditions. The microtubules fail to contact the cortex, and the molecular signals essential for cleavage plane specification (for example, aurora B and polo-like kinase 1 (PLK1)) are therefore not correctly delivered. Consequently, active RhoA, the principal orchestrator of cytokinesis, does not concentrate at the division site, and the contractile ring is not formed¹³³. During postnatal growth, cytokinesis failure events occur around the time of weaning¹³³, a period associated with profound changes in feeding behaviour, hormone concentrations and metabolic pathways¹³⁵. Indeed, insulin has been identified as a key factor in the genesis of binucleate tetraploid hepatocytes^{136,137}. In rodents, impairment of insulin signalling greatly decreases the formation of binucleate progenies, whereas repeated insulin injections promote the generation of polyploid liver cells. The phosphoinositide 3-kinase (PI3K)–AKT pathway appears to be the principal downstream pathway that mediates the cellular effects of insulin in these conditions. Various studies have revealed that PI3K–AKT

REVIEWS



regulates actin cytoskeleton polarization and reorganization during processes such as cell migration and invasion¹³⁸. The inhibition of AKT activity in dividing hepatocytes induces the correct reorganization of actin during mitosis and the correct localization of RhoA to the site of division, which is essential for successful cytokinesis^{136,137}. Other factors have also been shown to control binucleation during liver development. E2F transcription factors, which are master regulators of cell cycle progression¹³⁹, are also essential. This family includes activators (E2F1, E2F2 and E2F3), repressors (E2F4, E2F5 and E2F6) and two atypical repressors (E2F7 and E2F8). In the mouse liver, E2F1–E2F6 levels are low throughout life, whereas E2F7 and E2F8 levels are high during the first 7 weeks after birth, a period that coincides with liver polyploidization¹¹⁸. E2f7 and E2f8

double-knockout mouse livers were highly enriched with diploid hepatocytes (60–70% of hepatocytes in knockout versus 3–4% in control livers)^{94,118,140}. A substantial portion of the deregulated transcripts identified in E2f7 and E2f8 double-knockout mouse livers were involved in cytokinesis (*Ect2*, *Mklp1* and *Racgap1*). Interestingly, during hepatocyte binucleation, the activities of epithelial cell transforming sequence 2 (ECT2), mitotic kinesin-like protein 1 (MKLP1) and Rac GTPase Activating Protein 1 (RACGAP1) are impaired in relaying information from the spindle to the cortex, thereby preventing the formation of a functional contractile actomyosin ring and, therefore, cytokinesis¹³³. E2F transcription factors have already been identified as key factors in the polyploidization process in *A. thaliana* and *D. melanogaster*^{141–143}. A similar phenomenon has been

◀ **Fig. 3 | Polyploidization during postnatal liver growth.** **a** | Polyploidization of hepatic tissue is a progressive developmental process that takes place around the time of weaning and is regulated by insulin, phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-mechanistic target of rapamycin complex 2 (mTORC2), E2F and microRNA miR-122 signalling. At birth, hepatocytes are exclusively diploid mononucleate (2n). During postnatal liver development after weaning, diploid hepatocytes can either enter the normal cell cycle, giving rise to two diploid hepatocytes, or follow an aberrant cell cycle that is characterized by incomplete cytokinesis, giving rise to one binucleate tetraploid ($2 \times 2n$) hepatocyte. Progressive polyploidization takes place via this process in the liver parenchyma, and tetraploid (4n) and octoploid (8n) cells with one or two nuclei are formed. Up to 90% of adult hepatocytes in rodents and approximately 30% in humans are polyploid. **b** | During the complete cytokinesis process (left panel), the cytokinetic machinery (MgcRacGAP) (red; left upper panel) localizes during anaphase both on the central spindle and on astral equatorial microtubules and during telophase at the midbody. Consequently, Ras homologue gene family member A (RhoA) (green; left lower panel), the major cytokinesis orchestrator, accumulates at the equatorial cortex in early telophase, leading to the formation of the cytokinetic ring and the genesis of two diploid progenies. During incomplete cytokinesis (right panel), microtubules are disorganized (green; right upper panel). Consequently, MgcRacGAP (red; right upper panel) is observed on the remaining interdigitating microtubules in anaphase and telophase but is never localized on unattached astral equatorial microtubules, indicating that molecular signals delivered by microtubules to the equatorial cortex are impaired. Furthermore, RhoA (green; right lower panel) does not correctly localize at the equatorial cortex and is instead observed near the cell centre, close to central spindle microtubules. Consequently, activation of RhoA GTPase in the central cortex is impaired, leading to the genesis of binucleate progeny. n, chromosome number. Part **b** adapted with permission from REF.¹³³, *Journal of Cell Science* (<https://doi.org/10.1242/jcs.016907>).

described for trophoblast giant cells¹⁴¹ and endometrial stromal cells¹⁴⁴ in mice. Interestingly, microRNAs (miRNAs) are also drivers of physiological binucleation¹³². Mouse liver miRNAs are expressed in an age-dependent manner, and a subset of these molecules, miR-122 in particular, is differentially expressed during postnatal development. *Mir122*-knockout livers displayed a 60–70% reduction in the number of polyploid hepatocytes, a defect that was rescued by miR-122 overexpression¹³². During liver development, miR-122 directly antagonizes pro-cytokinesis targets, thereby regulating hepatocyte binucleation¹³². Finally, the silencing of cell cycle regulator genes, such as *Cdk1* (REF.¹⁴⁵), *Trp53* (REFS^{146,147}), *Cdkn1a* (REFS^{147,148}), *cMyc*¹⁴⁹, *Ccne*¹⁵⁰, *Birc5* (which encodes survivin)¹⁵¹, *Ssu72* (REF.¹⁵²), *Stk3* (also known as *Mst1/2*)¹⁵³, *Tgfb1* (REF.¹⁵⁴) and *Rb1* (REFS^{147,155}), has been shown to modify cellular or nuclear liver polyploidization in various mouse models. However, the roles of these diverse genes in controlling the cell cycle and division during liver development in relation to binucleation are unknown. Together, these studies highlight the essential contribution of cytokinesis failure to physiological liver polyploidization. Future studies should investigate how the combined activities of AKT, mechanistic target of rapamycin complex 2 (mTORC2), E2F7, E2F8 and miR-122 lead to inhibition of the cytokinesis machinery and the expansion of binucleate hepatocytes during liver development.

Polyploidy in regeneration after injury

The liver is continually exposed to tissue injuries and stresses throughout life. In the adult human liver parenchyma, hepatocytes are slowly replaced, with each cell having a mean lifespan of approximately 200–300 days¹⁵⁶, but they retain the ability to proliferate rapidly in response to aggression. The induction of liver

regeneration by partial hepatectomy is a model of compensatory hypertrophy, and several studies have revealed changes in ploidy profile during this process. All hepatocytes enter the cell cycle after partial hepatectomy. By the end of the regenerative process, cellular ploidy (binucleate polyploid hepatocytes) decreases and nuclear ploidy (mononucleate polyploid populations) increases^{157–161} (FIG. 4). Interestingly, Wilkinson et al. demonstrated that the global ploidy spectrum remained unchanged after complete liver regeneration in the partial hepatectomy mouse model¹⁴⁶, which suggests that the decrease in cellular ploidy is compensated for by the increase in nuclear ploidy. Miyaoka et al. have used cell lineage approaches and a high-throughput imaging system to investigate the mechanisms controlling polyploidization during mouse liver regeneration³⁸. They found that although all hepatocytes entered the cell cycle after partial hepatectomy and progressed into the S phase, only about half continue through mitosis, suggesting that some hepatocytes undergo endoreplication (leading to amplification of nuclear ploidy). Importantly, hepatocytes that go into mitosis undergo cell division (the genesis of mononucleate progenies). Thus, in contrast to liver development, during liver regeneration there is a shift from cellular polyploidy (polyploid hepatocytes, predominantly binucleate) to nuclear polyploidy (polyploid hepatocytes, predominantly mononucleate) (FIG. 4). Pathological conditions, such as hepatic metabolic overload (of iron or copper)^{162–166}, telomere attrition¹⁶⁵ and chronic viral infection (HBV and HCV)^{122,123,166}, also promote liver polyploidization, by as yet uncharacterized mechanisms (FIG. 4). Polyploidy spectrum has also been characterized in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)^{31,167} (FIG. 4). In mice models of NAFLD, there was an enrichment of highly polyploid mononucleate hepatocytes in the fatty liver parenchyma. The same phenotype was observed in patients with non-alcoholic steatohepatitis. The key question is how these cells are generated. The cell cycles of normal hepatocytes were compared with fatty hepatocytes in mouse primary cultures. Fatty hepatocytes progressed through the G1 phase and entered the S phase, but their progression through the S and G2 phases was delayed relative to control cells. This delay was associated with the activation of a G2–M 'DNA damage signal' (ATR–p53–p21 pathway) that precludes the activation of the mitotic kinase (CDK1–cyclin B) and leads to endoreplication^{31,167}. This work led to the identification of oxidative stress as a key driver of pathological polyploidization in the livers of patients with NAFLD. These findings provided the first demonstration of the generation, by endoreplication, of pathological polyploid hepatocytes in a damaged liver, through activation of a DNA damage-signalling axis. It is tempting to speculate that endoreplication is a favoured mode of liver tissue repair, but further studies are needed to determine how various genotoxic stresses and cell cycle regulators act together to promote endoreplication, and also the fate of the polyploid hepatocytes generated in such conditions. Emerging data from multiple experimental models have suggested a conserved role for endoreplication as an alternative means of proliferation in a context of genome instability^{57,66}.

REVIEWS

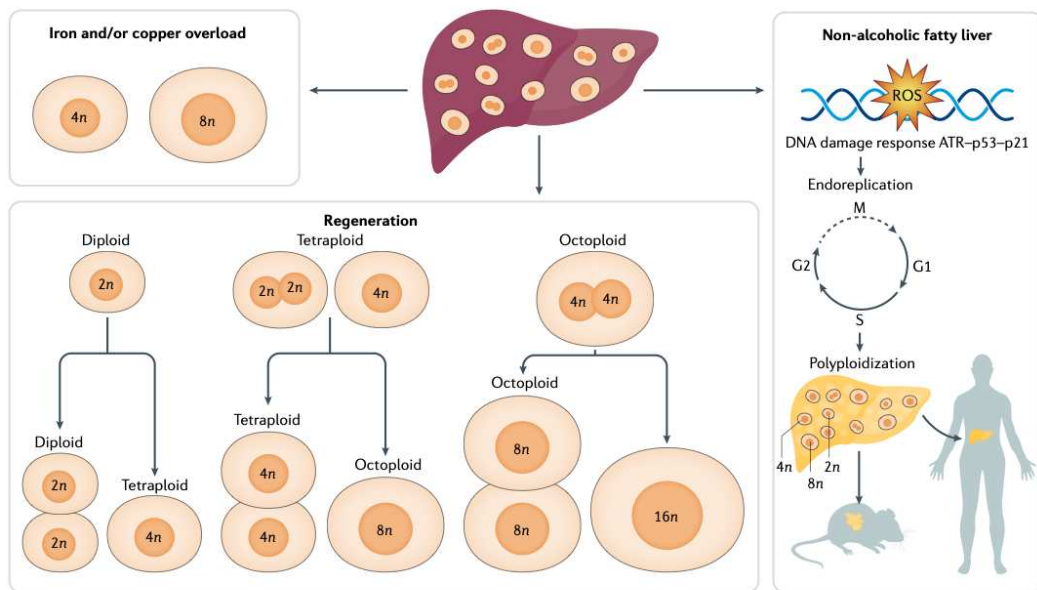


Fig. 4 | Genesis of mononucleate polyloid hepatocytes in physiopathological contexts. In human and mouse models of non-alcoholic fatty liver disease, the oxidative stress caused by an increase in levels of reactive oxygen species (ROS) induces the activation of the DNA damage response (ATR–p53–p21). This activation leads to multiple endoreplication cycles, generating polyloid mononucleate hepatocytes (for example, a tetraploid mononucleate (4n) cell or an octoploid mononucleate (8n) cell). During liver regeneration, there is also a shift from cellular ploidy to nuclear ploidy (for example, a diploid binucleate (2n) cell can form two 4n cells, and a tetraploid binucleate (2 × 2n) cell can form two 8n cells or a 16n mononucleate cell). The hepatic parenchyma is also enriched in polyloid mononucleate hepatocytes (for example, 4n and 8n cells) following an iron or copper overload. ATR, ATM and RAD3-related; n, chromosome number.

Effects of polyploidy on liver function

Is hepatocyte polyploidization merely a manifestation of the physiological growth or aggression of liver tissue, or do polyloid cells have functions that are physiologically relevant? The biological importance of liver polyploidization remains unclear, but various hypotheses have been proposed, some of which have already been partially validated.

Polyploidization stage and terminal differentiation.

Pioneering studies in rodents and humans have shown liver polyploidy to be related to terminal differentiation and senescence^{121,130,159,160,168–170}. As a result, many studies have tried to determine whether a polyloid hepatocyte can still divide in response to different proliferation stimuli. Surprisingly, several groups argued that polyloid hepatocytes do not seem to undergo senescence but, rather, maintain a high rate of proliferation. For instance, polyloid hepatocytes have been shown to divide as much as the diploid contingent after partial hepatectomy^{28,171}. The livers of *E2f3*^{-/-} mice, which consist predominantly of diploid hepatocytes, have a regenerative capacity similar to that of wild-type livers, which have a large proportion of polyloid cells¹¹⁸. Similarly, in mouse models of chronic liver injury followed by competitive repopulation of hepatocytes, diploid and

octoploid hepatocytes have been shown to have equivalent repopulation potentials^{116,172}. By contrast, other studies have supported the idea that the polyloid state acts to suppress growth and restrict proliferation. Ganem et al. reported that cytokinesis failure during postnatal murine liver development triggers the Hippo–LATS2–p53 pathway, which restricts the growth of tetraploid hepatocytes¹⁷³. In addition, tetraploid murine hepatocyte growth has been shown to increase in *Trp53*^{-/-} mice (REFS^{146,173}). In 2018, Wilkinson et al. investigated whether diploid hepatocytes from wild-type mouse livers had a proliferative advantage compared with a polyloid contingent¹⁴⁰. They observed, both in vitro (primary mouse hepatocyte cultures) and in vivo (mouse liver regeneration assays), similar responses of diploid and polyloid hepatocytes to hepatic mitogens, indicating that proliferation kinetics are unrelated to differential responses to growth stimuli. However, they also showed that diploid hepatocytes entered and completed the cell cycle more rapidly than their polyloid counterparts. Differences were also observed among polyloid hepatocytes, with tetraploid cells entering the cell cycle more rapidly than octoploids. The authors suggested that cell cycle regulation might subtly differ between diploid and polyloid contingents (for example, early replication licensing and mitosis progression). The restrictive proliferation of the

polyploid contingent might be related solely to ageing. Diploid, tetraploid and octoploid hepatocytes from 2-month-old mice have identical capacities to repopulate the liver and do not express specific senescence markers, such as p16, p21 and p53 (REFS^{174,175}). However, as mice age, the expression of these senescence markers becomes substantially stronger in octoploid hepatocytes than in diploid and tetraploid hepatocytes, and the repopulation potential of the octoploid contingent also decreases^{174,175}. Collectively, these data suggest that polyploid hepatocytes retain the ability to respond to mitogen stimuli and to proliferate. However, during ageing, and possibly in some liver diseases, polyploidy might induce senescence-type changes. Studies are therefore required to improve our understanding of ploidy-specific proliferation in different liver injuries, such as chronic liver disease.

Polypliodization as an enhancer of liver functions.

Polypliodity is a common strategy for organogenesis in various systems and organs including the liver and, over the past 10 years, many studies in different experimental models have highlighted specific functions for polyploid cells^{72,24,25,176}. An innovative study by Rios et al. revealed a role for specific mammalian polyploid cells¹⁷⁷. They observed binucleate polyploid cells in the lactating mammary glands of several different species (including humans, cows and mice)¹⁷⁷. In mice, aurora kinase A (AURKA) and PLK1 control the generation of these binucleate cells by cytokinesis failure at the time of the switch to lactation in response to various signals, including prolactin and epidermal growth factor. The binucleate alveolar cells were shown to be essential for lactation. Deletion of *Aurka* inhibited the formation of binucleate cells and decreased milk synthesis¹⁷⁷.

The liver participates in diverse functions, and it is tempting to speculate that physiologically polyploid hepatocytes have their own features and roles. The gene expression profile in the liver changes throughout the lobule (along the portocentral axis), resulting in a spatial zonation of tasks^{104–108}. Several groups have investigated whether polyploid hepatocytes display a specific distribution within mouse hepatic lobules that might account for specific functions, but the findings of these studies are conflicting. Some studies suggested that the periportal region contains fewer polyploid hepatocytes than the perivenous region^{117,170}, whereas others suggested that the proportions of polyploid cells were similar in both regions^{118,133}. Two studies used tissue-imaging systems to reconstruct spatial zonation in the murine liver and to quantify hepatocyte polyploidy^{128,178}. They showed that the periportal and perivenous regions were enriched in tetraploid hepatocytes but had a low density of octoploid hepatocytes, whereas the mid-lobule region (equidistant between the periportal and perivenous regions) displayed the opposite pattern: it was enriched in octoploid hepatocytes but had a low density of tetraploid hepatocytes. They concluded that liver polyploidy proceeds in spatial waves, advancing more rapidly in the mid-lobule region than in the periportal and perivenous zones. One study investigated whether this zonation of polyploidy was conserved in normal human hepatic lobules.

Bou-Nader et al. observed that neither mononucleate ($4n$ or $\geq 8n$) nor binucleate ($2 \times 2n$ or $\geq 2 \times 4n$) polyploid hepatocytes had a specific zonal distribution¹¹⁹. Much less is known about metabolic zonation in the human liver than in the mouse liver¹⁰⁷. Single-cell in situ experiments will be required to analyse the combined effects of metabolic zonation and polyploidy on hepatocyte fate.

A simple model used to explain the effects of polyploidy on cellular functions involves increases in transcription and translation on a per cell basis (for example, twice as many genes would produce twice as many proteins)^{176,179,180}. However, the situation is not quite that simple, as it has been shown in numerous species (for example, plants, *Drosophila* and mammalian cells) that polyploidy promotes non-uniform genome, transcriptome, epigenome and metabolome modifications¹⁷⁶. A few years ago, Lu et al. used a microarray approach to analyse the gene expression profile of fluorescence-activated cell sorting-isolated diploid, tetraploid and octoploid hepatocytes from wild-type mice¹⁸¹. Surprisingly, only a few differences in gene expression profile between the different populations were found. Kreutz et al. suggested that gene expression profiles differ between diploid and mononucleate polyploid hepatocytes, but not between diploid and binucleate polyploid hepatocytes¹⁸². This finding would suggest that increases in nuclear ploidy in the liver parenchyma affect hepatocyte fate, a hypothesis that was tested in mice that lack the mitotic kinase CDK1. Following partial hepatectomy, *Cdk1*-knockout livers regenerate fully but hepatocytes endoreplicate, resulting in a large proportion of mononucleate polyploid hepatocytes in the liver¹⁴⁵. Using this model, Miettinen et al. showed that higher ploidy levels were associated with lower levels of expression of mitochondrial and de novo lipid biosynthesis genes and with higher levels of expression of glycolysis genes¹⁸⁰. The inhibition of mitochondrial functions and lipid synthesis increases cell size in human epithelial cells, suggesting a possible causal link between cellular metabolism and polyploidy¹⁸⁰. These results are consistent with the results of a comparative genome-scale analysis of mouse and human liver tissues with different levels of polyploidy, in which highly polyploid livers displayed anaerobic energy production, with ATP obtained from carbohydrates rather than from fatty acids^{183,184}. Collectively, these results suggest a probable link between polyploidy and energy demands. Cells that display endoreplication or cytokinesis failure can channel the energy that would have otherwise gone into cell division (in particular, ATP and lipid membrane consumption) for other purposes⁹⁸. Thus, polypliodization might facilitate rapid adaptation to stresses and new environmental cues. Finally, Itzkovitz and co-workers demonstrated that liver polyploidy dampens the intrinsic variability associated with transcriptional bursts¹⁸⁵. In prokaryotes and eukaryotes, many genes are transcribed in bursts, with stochastic production of mRNA from the transcription sites, and with transcription switching between 'on' and 'off' states¹⁸⁶. Using single-molecule fluorescence in situ hybridization, the authors demonstrated that gene expression in the intact mouse liver consists of transcriptional bursts¹⁸⁵. They observed that transcriptional noise tends to be

lower in tetraploid hepatocytes than in diploid hepatocytes. The authors suggest that liver polyploidization might therefore counteract the noise increase caused by genes increasingly being transcribed in bursts with age, leading to a more controlled gene expression.

Polyploidization creates genetic diversity. Proliferating polyploid hepatocytes can increase their DNA content, but they can also reduce it, through a process known as ploidy reversal^{116,120,187}. Polyploid hepatocytes have larger numbers of chromosomes than their diploid counterparts, but they also have supernumerary centrosomes. For example, tetraploid hepatocytes (mononucleate or binucleate) have two centrosomes in G1–S phases and four centrosomes in G2–M phases⁸⁸. In most cases, proliferating polyploid hepatocytes form a bipolar mitotic spindle through a specific centrosome cluster (two centrosomes at each spindle pole), leading to the generation of polyploid progenies^{88,116} (FIG. 4). Polyploid hepatocytes can also form multipolar mitotic spindles and, in this case, cell division can lead to the generation of three or more daughter cells with lower ploidy states than maternal cells (a phenomenon known as ploidy reversal)¹¹⁶ (FIG. 4). The formation of a multipolar mitotic spindle is also linked to chromosome segregation errors that arise from merotelic chromosome attachments (the attachment of one kinetochore to both mitotic spindle poles). In this case, the division of polyploid hepatocytes leads to random whole-chromosome gains and/or losses, resulting in aneuploid contingents^{116,120}. The connection between polyploidy, ploidy reversal and aneuploidy has been called the ‘ploidy conveyor’¹⁰⁹. Interestingly, aneuploidy is observed in many different healthy human tissues, including those of the skin, brain and placenta^{116,120,187–190}. However, the degree of aneuploidy in the healthy liver remains a matter of debate. Studies of proliferating polyploid hepatocytes in primary mouse culture have revealed high rates of chromosome segregation errors and aneuploidy (approximately 60%)^{118,191}. By contrast, single-cell sequencing of hepatocytes in mouse and human liver tissues has revealed only a low level of aneuploidy (about 5%)¹⁸⁷. An elegant study by Knouse et al. examines the importance of the tissue environment for chromosome segregation fidelity in the polyploid liver¹⁷¹. By comparing images of mitotic polyploid hepatocytes in mouse regenerating liver or in primary cultures, they demonstrated that tissue architecture is particularly important for the correction of merotelic attachments and, therefore, for chromosome segregation fidelity in the polyploid liver¹⁷¹. Grompe and colleagues have developed a sophisticated multicolour reporter allele system to genetically label and trace mouse polyploid hepatocytes in situ¹⁹². They observed that polyploid hepatocytes regenerate injured livers while undergoing ploidy reduction. Ploidy-reduced progenies proliferate and maintain their ability to increase their ploidy content. Importantly, they observed that chromosome segregation during ploidy reduction is not random but faithful. All of these data reinforce our view that the ploidy conveyor model is intriguing, not least because it could generate genetic diversity in the healthy liver. Duncan et al. have analysed the role of hepatic aneuploidy in chronic liver injury¹⁹¹,

using *Fah*^{-/-} mice, a well-known model of hereditary tyrosinaemia type 1 (REF.¹⁹³). In response to massive liver failure, hepatocytes with a partial loss of chromosome 16 expanded, repopulated the liver and restored liver function¹⁹¹. The partial loss of chromosome 16, which carries the gene that encodes homogentisate 1,2-dioxygenase, confers resistance to the disease in this model of liver injury. Interestingly, a loss of polyploidy in the liver (*E2f7* and *E2f8* double-knockout mouse model) resulted in decreased aneuploidy rates and decreased the ability of the liver to adapt to tyrosinaemia-induced liver failure¹⁹⁴. Further studies are now required to determine whether ploidy reversal and specific aneuploid hepatocytes can facilitate adaptation in chronic human liver diseases.

Benefits of polyploidization for tissue repair. Polyploidy can be beneficial after acute organ failure in different organs, as shown in *Drosophila* in particular. Losick et al. have shown that polyploidization contributes to wound healing in adult *D. melanogaster* epithelia¹⁹⁵. Indeed, the epithelial cells that surround the injury site re-enter the S phase, but, rather than dividing, these cells undergo endocycling and become polyploid. In this case, epidermal repair is inhibited when polyploidy is blocked. In mammals, polyploidy can also be beneficial for tissue repair (for example, in mice and humans)^{24,25,196}. In an elegant study, Cao et al. devised genetic tools and live imaging methods for visualizing cell cycle dynamics during the regeneration of the zebrafish epicardium²⁶. Their results demonstrate that cells in the leading edge (called ‘leader cells’) of the regenerating epicardium undergo endoreplication or cytokinesis failure and generate polyploid cells. Further from the lesion, ‘follower cells’ complete the cell cycle. An increase in mechanical tension at the leading edge was found to be a key factor driving polyploidy. Interestingly, most polyploid leader cells undergo apoptosis when regeneration is complete. These results suggest that mechanical tension within a tissue can favour polyploidy to support tissue regeneration²⁶.

As the liver is the most robust regenerative organ in the human body and one of the best examples of polyploid tissues, it was tempting to speculate that the polyploid contingent has a major role in tissue repair. As described above, polyploid hepatocytes proliferate during mouse liver regeneration after partial hepatectomy. Surprisingly, these cells are as effective as diploid hepatocytes at restoring injured tissues²⁸. This phenomenon has been analysed in the liver of *E2f7* and *E2f8* double-knockout mice presenting reduced polyploidy. Resected polyploid livers (wild type) support regeneration as effectively as resected predominantly diploid livers (*E2f7* and *E2f8* double-knockout)^{118,197}. Furthermore, no difference in regeneration was observed when wild-type and *E2f7* and *E2f8* double-knockout livers were treated acutely with hepatotoxins, such as carbon tetrachloride or 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine^{64,118}. These results suggest that the restoration of liver size by polyploid cell growth during liver regeneration after partial hepatectomy or after acute injury is not beneficial. Future studies will determine whether polyploidization is beneficial for tissue repair following chronic liver injury.

Polyploidy in liver tumorigenesis

Polyloid cells have been observed in multiple cancer types, such as pancreatic¹⁹⁸, cervical⁵³, lung¹⁹⁹, colon²⁰⁰ and prostate²⁰¹ cancer. Genomic studies have revealed that approximately 30% of solid tumours have polyloid or near-polyloid karyotypes^{36,202}. Clinically, polyploidy has been associated with aggressive, difficult-to-treat different solid tumours (for example, colorectal and pancreatic cancers)^{79,202,203}. Numerous studies have observed that polyloid cells are present at the transition from pre-malignant to malignant disease, suggesting that a genome-multiplying event can be a driver of tumorigenesis^{53,204,205}. It is therefore not surprising that mechanisms have evolved to limit the proliferation of these cells. It has been well illustrated that the p53 pathway limits the proliferation of polyloid cells to protect

genomic integrity^{30,206,207}. Polyloid cancer cells (specifically, colorectal and fibrosarcoma) can also be recognized by the immune system in such a way that their growth is suppressed or delayed^{73,208}. It has been demonstrated that CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, the interferon system²⁰⁹ and natural killer cells²¹⁰ are involved in the control of polyloid cells. One of the mechanisms by which polyloid cells can be recognized by the immune system is an endoplasmic reticulum stress response resulting in the exposure of the 'eat-me' signal calreticulin at the cell surface^{209,211}. Senovilla et al. also demonstrated that polyloid mouse colon cancer cells readily proliferated in immunodeficient mice and conserved their increased DNA content²⁰⁹. Interestingly, the same cells injected into immunocompetent mice generated tumours only after a delay, and those tumours exhibited reduced DNA content, endoplasmic reticulum stress and calreticulin exposure²⁰⁹.

The accepted model is that tetraploidy drives carcinogenesis by acting as a stochastic generator of genomic instability. As described earlier, polyloid cells have supernumerary centrosomes, and this feature is linked to high rates of chromosome mis-segregation in mitosis^{206,212,213}. Also, one study neatly showed in colorectal cancer cell lines that tetraploidy induces replication stress through a massive deregulation of genes that are involved in the correct functioning of the DNA replication machinery²¹⁴. Replication stress has emerged as a source of chromosomal instability²¹⁵. Several laboratories working on different experimental models have shown that polyploidy is a gateway to tumorigenesis^{34,69,203,216}. The pioneering experiments were performed by David Pellman and colleagues, who showed that *TP53*^{-/-} tetraploid mammary epithelial cells gave rise to malignant tumours in nude mice, whereas *TP53*^{-/-} diploid mammary epithelial cells did not^{54,216}. This finding led to the suggestion that tetraploidy causes tumorigenesis. The temporal relationship between *TP53* mutations and polyploidy has been analysed in tumours from prospectively characterized patients with advanced cancers (for example, colorectal, pancreatic, lung and uterine cancer)²⁰². As expected, polyploidy was statistically significantly associated with *TP53*-mutated tumours. Interestingly, telomerase reverse transcriptase (*TERT*) promoter mutations are associated with an E2F-mediated G1 arrest defect, but not with polyploidization²⁰². Overall, these data suggest that polyploidization can be a key step in tumour formation and progression.

The link between polyploidy and the origin of cancer has primarily been demonstrated in tissues that are physiologically diploid. The role of polyploidy during liver tumorigenesis is quite puzzling, owing to the physiologically polyloid state of normal adult liver. Whether polyploidy is a risk factor for or protective against malignant transformation was until recently unknown. The most widely-accepted hypothesis is that liver polyploidy acts as a gatekeeper of tumorigenesis²¹⁷. In theory, physiological polyploidization could protect cells against genotoxic damage by increasing gene copy numbers per cell, which could at least buffer gene-inactivating mutations^{22,176}. We can easily imagine that in a diploid cell

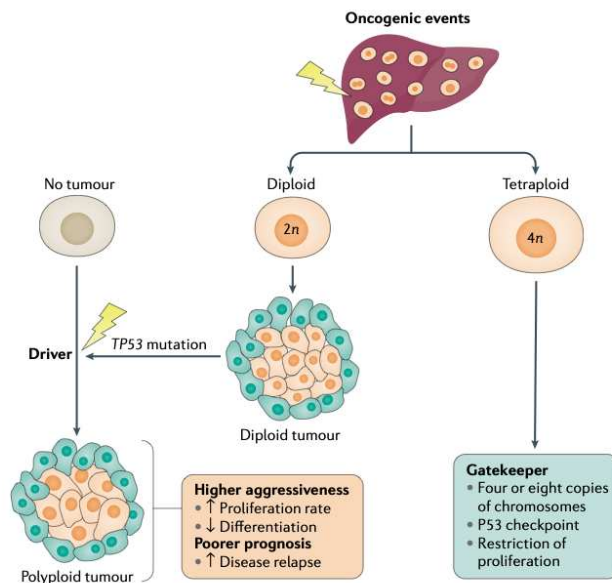


Fig. 5 | The polyloid state: gatekeeper or driver of liver tumorigenesis? Depending on the context, and especially on the *TP53* status (that is, mutated or wild type), the polyloid state can be regarded as a gatekeeper or a driver of hepatocarcinogenesis. Indeed, polyloid hepatocytes (for example, a tetraploid mononucleate (4n) cell and an octoploid mononucleate (8n) cell) are more resistant to oncogenic events than diploid (2n) hepatocytes because they possess extra copies of tumour suppressor genes, which confers protection against loss of heterozygosity by buffering the effects of inactivating mutations. Furthermore, the polyloid state can hinder hepatocyte proliferation by means of the p53-dependent 'tetraploid checkpoint', which restricts proliferation and favours commitment to cell death. It is therefore thought that liver tumours stem from diploid hepatocytes. *TP53* mutation represents a crucial event in the development of polyloid tumours, which are associated with enhanced aggressiveness and poor prognosis. Indeed, interfering with the p53 pathway allows polyloid cells to resume the cell cycle despite exhibiting deleterious chromosomal instability, which ultimately leads to aneuploidy. Hence, the polyloid state acts as a tumour-promoting mechanism by amplifying genomic aberrations and exacerbating tumour aggressiveness. However, it remains unknown whether polyloid tumours arise from a proliferating polyloid clone or from an initiating diploid tumour that has subsequently undergone polyploidization. Lightning bolts indicate the location of cell cycle anomalies, such as lagging chromosomes or cytoskeleton disorganization. n, chromosome number.

the loss of heterozygosity of a tumour suppressor gene could have dramatic consequences, such as uncontrolled proliferation. Acquiring multiple sets of chromosomes could provide backup tumour suppressor gene copies. In a series of elegant experiments, Zhang et al. demonstrated that polyploid mouse livers were protected from tumour suppressor loss of heterozygosity¹⁹⁷. To modify the liver ploidy spectrum, two genes were silenced: *Anln*, an actin-binding protein required for cytokinesis, and *E2f8*, which is required for liver polyploidization. Ploidy was substantially increased after *Anln* knockdown (resulting in livers in which the majority of hepatocytes were polyploid) and decreased after *E2f8* knockdown (resulting in livers in which the majority of hepatocytes were diploid). The authors observed that higher levels of polyploidy reduced the tumour incidence in diverse mouse liver cancer models, suggesting that polyploidy helps to prevent tumour development. Notably, in this study, ploidy content has been modified in non-tumoural liver tissue with wild-type *Trp53*. As demonstrated in others contexts, it is likely that polyploidy in the absence of *Trp53* could be a driver of liver tumorigenesis. The presence of polyploid cells within liver tumours could also act as a driver of tumour progression. In 2019, an in situ imaging approach was developed to determine whether cellular and nuclear ploidy content is altered during human liver tumorigenesis¹¹⁹. The ploidy spectra of surgically resected tissues from patients with hepatocellular carcinoma (HCC) as well as from healthy controls were determined. These data show that the binucleate polyploid fraction, or cellular ploidy, is drastically reduced during human liver tumorigenesis (≈15% in normal tissue versus 5% in tumoural tissue). Conversely, the mononucleate polyploid fraction, or nuclear ploidy, is amplified in HCCs (≈12% in normal tissue versus 33% in tumoural tissue). Next, Bou-Nader et al. compared nuclear ploidy spectra on the basis of histological and molecular features of HCC tumours¹¹⁹. Nuclear ploidy was sufficient to distinguish between pre-malignant and malignant liver parenchyma. Mononucleate polyploid hepatocytes were enriched in HCCs that harboured a low grade of differentiation, a high proliferation rate and a poor prognosis. Furthermore, it was observed that *TP53* mutations account for a higher percentage of mononucleate polyploid hepatocytes than both *TERT* promoter-mutated and *CTNNB1*-mutated HCCs.

Taken together, these results indicate that polyploid hepatocytes act as a kind of 'Jekyll and Hyde' during liver tumorigenesis (FIG. 5). A polyploid state could provide protection from tumorigenesis by providing extra copies

of tumour suppressor genes and by restricting hepatocyte proliferation in pre-malignant tissue with wild-type *TP53*. Conversely, amplification of mononucleate polyploid hepatocytes within HCCs is associated with *TP53* mutations, a high proliferative rate and a poor prognosis.

Conclusions

Polyploidization is a fascinating mechanism that is essential for tissue homeostasis but also has a role in tumorigenesis. Studies have revealed that the liver is one of the few mammalian organs to display changes in ploidy in various circumstances. In physiological conditions, progressive polyploidization occurs during liver development and in ageing, indicating terminal differentiation. We have learned much about the generation of polyploid hepatocytes through cytokinesis failure, but we still have much to learn about the function of these cells in liver homeostasis.

There are still important questions that need to be addressed. Is there a difference in cellular states between diploid and polyploid hepatocytes (that is, in epigenetics, transcriptomes, proteomes and so on)? Is there a limit to hepatocyte ploidy? How do polyploid hepatocytes cope with genome copy number variation and centrosome amplification? Finally, what are the molecular cues of the ploidy conveyor, and does liver aneuploidy affect human health?

The liver parenchyma displays changes in ploidy following tissue injury or stress, particularly in the context of NAFLD. Future studies should aim to understand whether pathological polyploidization takes place in other pathologies, and to determine how these polyploid contingents behave in damaged livers. Do they have specific lobule zonation? Do they influence disease progression? It will be particularly interesting to determine whether hepatocyte polyploidization affects the process of liver infection (for example, of HCV and HBV). Interestingly, *Plasmodium* parasites have been shown to preferentially infect and develop in polyploid hepatocytes²¹⁸.

Finally, a major challenge in this field will be to determine whether polyploid HCCs derive from polyploid or diploid hepatocytes. If they are derived from polyploid hepatocytes, then the use of polyploidization to protect the liver would be dangerous. Conversely, if polyploid tumours arise from diploid hepatocytes, then the polyploid state might provide protection in pathological settings by providing extra copies of tumour suppressor genes and restricting hepatocyte proliferation.

Published online: 02 April 2020

- O'Brien, S. J., Menninger, J. C. & Nash, W. G (eds). *Atlas of mammalian chromosomes*. (Wiley, Hoboken, 2006).
- Otto, S. P. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* **131**, 452–462 (2007).
- Weaver, B. A. & Cleveland, D. W. Does aneuploidy cause cancer? *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 658–667 (2006).
- Gallagher, J. P., Grover, C. E., Hu, G. & Wendel, J. F. Insights into the ecology and evolution of polyploid plants through network analysis. *Mol. Ecol.* **25**, 2644–2660 (2016).
- Dehal, P. & Boore, J. L. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol.* **3**, e314 (2005).
- Soltis, D. E., Visger, C. J. & Soltis, P. S. The polyploidy revolution then ... and now: Stebbins revisited. *Am. J. Bot.* **101**, 1057–1078 (2014).
- Van de Peer, Y., Mizrahi, E. & Marchal, K. The evolutionary significance of polyploidy. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 411–424 (2017).
- Leitch, A. R. & Leitch, I. J. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* **320**, 481–483 (2008).
- Otto, S. P. & Whitton, J. Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 401–437 (2000).
- Ramsey, J. & Schemske, D. W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **29**, 467–501 (1998).
- Jiao, Y. et al. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* **473**, 97–100 (2011).
- Soltis, D. E., Bell, C. D., Kim, S. & Soltis, P. S. Origin and early evolution of angiosperms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1133**, 3–25 (2008).
- Soltis, P. S. & Soltis, D. E. Ancient WGD events as drivers of key innovations in angiosperms. *Curr. Opin. Plant Biol.* **30**, 159–165 (2016).
- Mable, B., Alexandrou, M. A. & Taylor, M. I. Genome duplication in amphibians and fish: an extended synthesis. *J. Zool.* **284**, 151–182 (2011).
- Guc-Scekcic, M., Milasin, J., Stevanovic, M., Stojanovic, L. J. & Djordjevic, M. Tetraploidy in a

- 26-month-old girl (cytogenetic and molecular studies). *Clin. Genet.* **61**, 62–65 (2002).
16. Jacobs, P. A., Saulman, A. E., Funkhouser, J., Matsuura, J. S. & Wilson, C. C. Human triploidy: relationship between parental origin of the additional haploid complement and development of partial hydatidiform mole. *Ann. Hum. Genet.* **46**, 223–231 (1982).
 17. Wertheim, B., Beukeboom, L. W. & van de Zande, L. Polyploidy in animals: effects of gene expression on sex determination, evolution and ecology. *Cytogenet. Genome Res.* **140**, 256–269 (2013).
 18. Gallardo, M. H., Bickham, J. W., Honeycutt, R. L., Ojeda, R. A. & Kohler, N. Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* **401**, 341 (1999).
 19. Anzi, S. et al. Postnatal exocrine pancreas growth by cellular hypertrophy correlates with a shorter lifespan in mammals. *Dev. Cell* **45**, 726–737.e5 (2018).
 20. Oates, P. S. & Morgan, R. G. Changes in pancreatic acinar cell nuclear number and DNA content during aging in the rat. *Am. J. Anat.* **177**, 547–554 (1986).
 21. Davoli, T. & de Lange, T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 585–610 (2011).
 22. Pandit, S. K., Westendorp, B. & de Bruin, A. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends Cell Biol.* **23**, 556–566 (2013).
 23. Ravid, K., Lu, J., Zimmet, J. M. & Jones, M. R. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J. Cell Physiol.* **190**, 7–20 (2002).
 24. Gjelsvik, K. J., Besen-McNally, R. & Losick, V. P. Solving the polyploidy mystery in health and disease. *Trends Genet.* **35**, 6–14 (2019).
 25. Ovrebo, J. I. & Edgar, B. A. Polyploidy in tissue homeostasis and regeneration. *Development* **145**, 1–16 (2018).
 26. Cao, J. et al. Tension creates an endoreplication wavefront that leads regeneration of epicardial tissue. *Dev. Cell* **42**, 600–615.e4 (2017).
 27. Lazzeri, E. et al. Endocyte-related tubular cell hypertrophy and progenitor proliferation recover renal function after acute kidney injury. *Nat. Commun.* **9**, 1344 (2018).
 28. Miyaoka, Y. et al. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr. Biol.* **22**, 1166–1175 (2012).
 29. Auer, G. U., Backdahl, M., Forsslund, G. M. & Askensten, U. G. Ploidy levels in nonneoplastic and neoplastic thyroid cells. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **7**, 97–106 (1985).
 30. Ganem, N. J., Storchova, Z. & Pellman, D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**, 157–162 (2007).
 31. Gentric, G. et al. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* **125**, 981–992 (2015).
 32. Hixon, M. L. & Gualberto, A. Vascular smooth muscle polyploidization—from mitotic checkpoints to hypertension. *Cell Cycle* **2**, 105–110 (2003).
 33. Vliegen, H. W., Eulderink, F., Brusckhe, A. V., van der Laarse, A. & Cornelisse, C. J. Polyploidy of myocyte nuclei in pressure overloaded human hearts: a flow cytometric study in left and right ventricular myocardium. *Am. J. Cardiovasc. Pathol.* **5**, 27–31 (1995).
 34. Fujiwara, T. et al. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* **437**, 1043–1047 (2005).
 35. Jamal-Hanjani, M. et al. Tracking the evolution of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **376**, 2109–2121 (2017).
 36. Zack, T. I. et al. Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nat. Genet.* **45**, 1134–1140 (2013).
 37. Yanagimachi, R. & Noda, Y. D. Physiological changes in the postnuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells. *J. Ultrastruct. Res.* **31**, 486–493 (1970).
 38. Huppertz, B., Franik, H. G., Kingdom, J. C., Reister, F. & Kaufmann, P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem. Cell Biol.* **110**, 495–508 (1998).
 39. Loutit, J. F. & Nisbet, N. W. The origin of osteoclasts. *Immunobiology* **161**, 193–203 (1982).
 40. Taylor, M. V. Muscle differentiation: how two cells become one. *Curr. Biol.* **12**, R224–R228 (2002).
 41. Abmayr, S. M. & Pavlath, G. K. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* **139**, 641–656 (2012).
 42. Kim, J. H., Jin, P., Duan, R. & Chen, E. H. Mechanisms of myoblast fusion during muscle development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **32**, 162–170 (2015).
 43. Lluis, F. & Cosma, M. P. Cell-fusion-mediated somatic-cell reprogramming: a mechanism for tissue regeneration. *J. Cell Physiol.* **223**, 6–13 (2010).
 44. Alvarez-Dolado, M. et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425**, 968–973 (2003).
 45. Rizvi, A. Z. et al. Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 6321–6325 (2006).
 46. Sanges, D. et al. Wnt/ β -catenin signaling triggers neuron reprogramming and regeneration in the mouse retina. *Cell Rep.* **4**, 271–286 (2013).
 47. Wang, X. et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422**, 897–901 (2005).
 48. Weimann, J. M., Johansson, C. B., Trejo, A. & Blau, H. M. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat. Cell Biol.* **5**, 959–966 (2003).
 49. Duelli, D. & Lazebnik, Y. Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 968–976 (2007).
 50. Moody, C. A. & Laimins, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 550–560 (2010).
 51. Gao, P. & Zheng, J. High-risk HPV E5-induced cell fusion: a critical initiating event in the early stage of HPV-associated cervical cancer. *Virology* **427**, 288–298 (2012).
 52. Hu, L. et al. Human papillomavirus 16 E5 induces binucleated cell formation by cell-cell fusion. *Virology* **384**, 125–134 (2009).
 53. Olaharski, A. J. et al. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis* **27**, 337–343 (2006).
 54. Olaharski, A. J. & Eastmond, D. A. Elevated levels of tetraploid cervical cells in human papillomavirus-positive Papanicolaou smears diagnosed as atypical squamous cells of undetermined significance. *Cancer* **102**, 192–199 (2004).
 55. Hartwell, L. H. & Weinert, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629–634 (1989).
 56. Edgar, B. A. & Orr-Weaver, T. L. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* **105**, 297–306 (2001).
 57. Fox, D. T. & Duronio, R. J. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development* **140**, 5–12 (2013).
 58. Lee, H. O., Davidson, J. M. & Duronio, R. J. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev.* **23**, 2461–2477 (2009).
 59. Orr-Weaver, T. L. When bigger is better: the role of polyploidy in organogenesis. *Trends Genet.* **31**, 307–315 (2015).
 60. Edgar, B. A., Zielke, N. & Gutierrez, C. Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 197–210 (2014).
 61. Hu, D. & Cross, J. C. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 341–354 (2010).
 62. Ogawa, H. et al. Cell proliferation potency is independent of FGF4 signaling in trophoblast stem cells derived from androgenetic embryos. *J. Reprod. Dev.* **62**, 51–58 (2016).
 63. Ullah, Z., Kohn, M. J., Yagi, R., Vassilev, L. T. & DePamphilis, M. L. Differentiation of trophoblast stem cells into giant cells is triggered by p57/Kip2 inhibition of CDK1 activity. *Genes Dev.* **22**, 3024–3036 (2008).
 64. Chen, H. Z. et al. Canonical and atypical E2Fs regulate the mammalian endocycle. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1192–1202 (2012).
 65. Ouseph, M. M. et al. Atypical E2F repressors and activators coordinate placental development. *Dev. Cell* **22**, 849–862 (2012).
 66. Shu, Z., Row, S. & Deng, W. M. Endoreplication: the good, the bad, and the ugly. *Trends Cell Biol.* **28**, 465–474 (2018).
 67. Adachi, M. & Brenner, D. A. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Hepatology* **47**, 677–685 (2008).
 68. Radziejewski, A. et al. Atypical E2F activity coordinates PHR1 photolyase gene transcription with endoreduplication onset. *EMBO J.* **30**, 355–363 (2011).
 69. Davoli, T. & de Lange, T. Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. *Cancer Cell* **21**, 765–776 (2012).
 70. Davoli, T., Denchi, E. L. & de Lange, T. Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell* **141**, 81–93 (2010).
 71. Balachandran, R. S. & Kiprey, E. T. Addressing a weakness of anticancer therapy with mitosis inhibitors: mitotic slippage. *Mol. Cell Oncol.* **4**, e1277293 (2017).
 72. Mishima, M., Pavic, V., Gruneberg, U., Nigg, E. A. & Glotzer, M. Cell cycle regulation of central spindle assembly. *Nature* **430**, 908–913 (2004).
 73. Vitale, L., Galluzzi, L., Castedo, M. & Kroemer, G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 385–392 (2011).
 74. Rieder, C. L. & Maiato, H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev. Cell* **7**, 637–651 (2004).
 75. Sinha, D., Duijff, P. H. G. & Khanna, K. K. Mitotic slippage: an old tale with a new twist. *Cell Cycle* **18**, 7–15 (2019).
 76. Brito, D. A. & Rieder, C. L. Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr. Biol.* **16**, 1194–1200 (2006).
 77. Lee, J., Kim, J. A., Margolis, R. L. & Fotedar, R. Substrate degradation by the anaphase promoting complex occurs during mitotic slippage. *Cell Cycle* **9**, 1792–1801 (2010).
 78. Balachandran, R. S. et al. The ubiquitin ligase CRL2ZYG11 targets cyclin B1 for degradation in a conserved pathway that facilitates mitotic slippage. *J. Cell Biol.* **215**, 151–166 (2016).
 79. Coward, J. & Harding, A. Size does matter: why polyploid tumor cells are critical drug targets in the war on cancer. *Front. Oncol.* **4**, 123 (2014).
 80. Dikovskaya, D. et al. Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J. Cell Biol.* **176**, 183–195 (2007).
 81. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159–170 (1996).
 82. Caldwell, C. M. & Kaplan, K. B. The role of APC in mitosis and in chromosome instability. *Adv. Exp. Med. Biol.* **656**, 51–64 (2009).
 83. D'Avino, P. P., Giansanti, M. G. & Petronczki, M. Cytokinesis in animal cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a015834 (2015).
 84. Celton-Morizur, S. & Desdouets, C. Polyploidization of liver cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **676**, 123–135 (2010).
 85. Fortier, M., Celton-Morizur, S. & Desdouets, C. Incomplete cytokinesis/binucleation in mammals: the powerful system of hepatocytes. *Methods Cell Biol.* **137**, 119–142 (2017).
 86. Li, F., Wang, X., Bunker, P. C. & Gerdes, A. M. Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: I. Role of actin–myosin contractile ring. *J. Mol. Cell Cardiol.* **29**, 1541–1551 (1997).
 87. Zimmet, J. & Ravid, K. Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp. Hematol.* **28**, 3–16 (2000).
 88. Guidotti, J. E. et al. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 19095–19101 (2003).
 89. Li, F., Wang, X., Capasso, J. M. & Gerdes, A. M. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J. Mol. Cell Cardiol.* **28**, 1737–1746 (1996).
 90. Soonpaa, M. H. et al. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am. J. Physiol.* **271**, H2183–H2189 (1996).
 91. Bergmann, O. et al. Dynamics of cell generation and turnover in the human heart. *Cell* **161**, 1566–1575 (2015).
 92. Yuan, X. & Braun, T. Multimodal regulation of cardiac myocyte proliferation. *Circ. Res.* **121**, 293–309 (2017).
 93. Mollova, M. et al. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 1446–1451 (2013).
 94. Liu, Z., Yue, S., Chen, X., Rubin, T. & Braun, T. Regulation of cardiomyocyte polyploidy and multinucleation by CyclinG1. *Circ. Res.* **106**, 1498–1506 (2010).
 95. Engel, F. B., Schebesta, M. & Keating, M. T. Anillin localization defect in cardiomyocyte binucleation. *J. Mol. Cell Cardiol.* **41**, 601–612 (2006).
 96. Ahuja, P., Sdek, P. & MacLellan, W. R. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol. Rev.* **87**, 521–544 (2007).

REVIEWS

97. Storchova, Z. & Kuffer, C. The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *J. Cell Sci.* **121**, 3859–3866 (2008).
98. Storchova, Z. & Pellman, D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 45–54 (2004).
99. Tormos, A. M., Talens-Visconti, R. & Sastre, J. Regulation of cytokinesis and its clinical significance. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **52**, 159–167 (2015).
100. Lacroix, B. & Maddox, A. S. Cytokinesis, ploidy and aneuploidy. *J. Pathol.* **226**, 338–351 (2012).
101. Mullins, J. M. & Biesele, J. J. Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells. *J. Cell Biol.* **73**, 672–684 (1977).
102. Shi, Q. & King, R. W. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* **437**, 1038–1042 (2005).
103. Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P. & Duncan, S. A. Organogenesis and development of the liver. *Dev. Cell* **18**, 175–189 (2010).
104. Benhamouche, S. et al. Apc tumor suppressor gene is the “zonation-keeper” of mouse liver. *Dev. Cell* **10**, 759–770 (2006).
105. Gebhardt, R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol. Ther.* **53**, 275–354 (1992).
106. Jungermann, K. & Kietzmann, T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu. Rev. Nutr.* **16**, 179–203 (1996).
107. Ben-Moshe, S. & Itzkovitz, S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 395–410 (2019).
108. Halpern, K. B. et al. Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver. *Nature* **542**, 352–356 (2017).
109. Duncan, A. W. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Semin. Cell Dev. Biol.* **24**, 347–356 (2013).
110. Gentric, G. & Desdouets, C. Polyploidization in liver tissue. *Am. J. Pathol.* **184**, 322–331 (2014).
111. Brodsky, W. Y. & Uryvaeva, I. V. Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. *Int. Rev. Cytol.* **50**, 275–332 (1977).
112. Carriere, R. Polyploid cell reproduction in normal adult rat liver. *Exp. Cell Res.* **46**, 533–540 (1967).
113. Nadal, C. & Zajdela, F. [Polyploidy in the rat liver. II. The role of the hypophysin and protein deficiency]. *Exp. Cell Res.* **42**, 117–129 (1966).
114. Nadal, C. & Zajdela, F. Hepatic polyploidy in the rat. IV. Experimental changes in the nucleolar volume of liver cells and their mechanisms of regulation. *Exp. Cell Res.* **48**, 518–528 (1967).
115. Anatskaya, O. V., Vinogradov, A. E. & Kudryavtsev, B. N. Hepatocyte polyploidy and metabolism-life-history traits: hypotheses testing. *J. Theor. Biol.* **168**, 191–199 (1994).
116. Duncan, A. W. et al. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature* **467**, 707–710 (2010).
117. Gandillet, A. et al. Hepatocyte ploidy in normal young rat. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **134**, 665–673 (2003).
118. Pandit, S. K. et al. E2F8 is essential for polyploidization in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1181–1191 (2012).
119. Bou-Nader, M. et al. Polyploidy spectrum: a new marker in HCC classification. *Cut* **69**, 355–364 (2020).
120. Duncan, A. W. et al. Frequent aneuploidy among normal human hepatocytes. *Gastroenterology* **142**, 25–28 (2012).
121. Kudryavtsev, B. N., Kudryavtseva, M. V., Sakuta, G. A. & Stein, G. I. Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **64**, 387–393 (1993).
122. Toyoda, H. et al. Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis. *Gut* **54**, 297–302 (2005).
123. Toyoda, H., Kumada, T., Bregerie, O., Brechot, C. & Desdouets, C. Conserved balance of hepatocyte nuclear DNA content in mononuclear and binuclear hepatocyte populations during the course of chronic viral hepatitis. *World J. Gastroenterol.* **12**, 4546–4548 (2006).
124. Deschenes, J., Valet, J. P. & Marceau, N. The relationship between cell volume, ploidy, and functional activity in differentiating hepatocytes. *Cell Biophys.* **3**, 321–334 (1981).
125. Epstein, C. J. Cell size, nuclear content and the development of polyploidy in the mammalian liver. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **57**, 327–334 (1967).
126. Martin, N. C. et al. Functional analysis of mouse hepatocytes differing in DNA content: volume, receptor expression, and effect of IFN γ . *J. Cell Physiol.* **191**, 138–144 (2002).
127. Watanabe, T. & Tanaka, Y. Age-related alterations in the size of human hepatocytes. A study of mononuclear and binucleate cells. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **39**, 9–20 (1982).
128. Morales-Navarrete, H. et al. A versatile pipeline for the multi-scale digital reconstruction and quantitative analysis of 3D tissue architecture. *eLife* **4**, 1–29 (2015).
129. Kato, N. & Lam, E. Chromatin of endoreduplicated pavement cells has greater range of movement than that of diploid guard cells in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Sci.* **116**, 2195–2201 (2003).
130. Gupta, S. Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin. Cancer Biol.* **10**, 161–171 (2000).
131. Viola-Magni, M. P. Synthesis and turnover of DNA in hepatocytes of neonatal rats. *J. Microsc.* **96**, 191–203 (1972).
132. Hsu, S. H. et al. MicroRNA-122 regulates polyploidization in the murine liver. *Hepatology* **64**, 599–615 (2016).
133. Margall-Ducos, G., Morizur-Celton, S., Couton, D., Bregerie, O. & Desdouets, C. Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. *J. Cell Sci.* **120**, 3633–3639 (2007).
134. Wheatley, D. N. Binucleation in mammalian liver. Studies on the control of cytokinesis in vivo. *Exp. Cell Res.* **74**, 455–465 (1972).
135. Girard, J., Ferre, P., Pegorier, J. P. & Duce, P. H. Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling–weaning transition. *Physiol. Rev.* **72**, 507–562 (1992).
136. Celton-Morizur, S., Merlen, C., Couton, D. & Desdouets, C. Polyploidy and liver proliferation: central role of insulin signaling. *Cell Cycle* **9**, 460–466 (2010).
137. Celton-Morizur, S., Merlen, C., Couton, D., Margall-Ducos, G. & Desdouets, C. The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. *J. Clin. Invest.* **119**, 1880–1887 (2009).
138. Wullschlegler, S., Loewith, R. & Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471–484 (2006).
139. Wong, J. V., Dong, P., Nevins, J. R., Mathey-Prevot, B. & You, L. Network callisthenics: control of E2F dynamics in cell cycle entry. *Cell Cycle* **10**, 3086–3094 (2011).
140. Wilkinson, P. D. et al. The polyploid state restricts hepatocyte proliferation and liver regeneration. *Hepatology* **69**, 1242–1258 (2018).
141. del Pozo, J. C., Diaz-Trivino, S., Cisneros, N. & Gutierrez, C. The balance between cell division and endoreplication depends on E2F–DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin–SCF/SKP2 pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 2224–2235 (2006).
142. Shibutani, S. T. et al. Intrinsic negative cell cycle regulation provided by PIP box- and Cui4Cdt2-mediated destruction of E2F1 during S phase. *Dev. Cell* **15**, 890–900 (2008).
143. Zitelke, N. et al. Control of *Drosophila* endocycles by E2F and CRL4(CDT2). *Nature* **480**, 123–127 (2011).
144. Qi, Q. R. et al. Involvement of atypical transcription factor E2F8 in the polyploidization during mouse and human decidualization. *Cell Cycle* **14**, 1842–1858 (2015).
145. Diril, M. K. et al. Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 3826–3831 (2012).
146. Kurinna, S. et al. p53 regulates a mitotic transcription program and determines ploidy in normal mouse liver. *Hepatology* **57**, 2004–2013 (2013).
147. Sheahan, S., Bellamy, C. O., Treanor, L., Harrison, D. J. & Prost, S. Additive effect of p53, p21 and Rb deletion in triple knockout primary hepatocytes. *Oncogene* **23**, 1489–1497 (2004).
148. Wu, H. et al. Targeted in vivo expression of the cyclin dependent kinase inhibitor p21 halts hepatocyte cell cycle progression, postnatal liver development and regeneration. *Genes Dev.* **10**, 245–260 (1996).
149. Baena, E. et al. c-Myc regulates cell size and ploidy but is not essential for postnatal proliferation in liver. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 7286–7291 (2005).
150. Nevzorova, Y. A. et al. Aberrant cell cycle progression and endoreplication in regenerating livers of mice that lack a single E-type cyclin. *Gastroenterology* **137**, 691–703, 703.e1–6 (2009).
151. Li, D. et al. Hepatic loss of survivin impairs postnatal liver development and promotes expansion of hepatic progenitor cells in mice. *Hepatology* **58**, 2109–2121 (2013).
152. Kim, S. H. et al. Hepatocyte homeostasis for chromosome ploidy and liver function is regulated by Ssu72 protein phosphatase. *Hepatology* **63**, 247–259 (2016).
153. Zhang, S. et al. Hippo signaling suppresses cell ploidy and tumorigenesis through skp2. *Cancer Cell* **31**, 669–684.e7 (2017).
154. De Santis Puzzonnia, M. et al. TGF β induces binucleation/polyploidization in hepatocytes through a Src-dependent cytokinesis failure. *PLoS ONE* **11**, e0167158 (2016).
155. Mayhew, C. N. et al. Liver-specific pRB loss results in ectopic cell cycle entry and aberrant ploidy. *Cancer Res.* **65**, 4568–4577 (2005).
156. Magami, Y. et al. Cell proliferation and renewal of normal hepatocytes and bile duct cells in adult mouse liver. *Liver* **22**, 419–425 (2002).
157. Geschwind, I. J., Alfert, M. & Schooley, C. Liver regeneration and hepatic polyploidy in the hypophysectomized rat. *Exp. Cell Res.* **15**, 232–235 (1958).
158. Faktor, V. M. & Uryvaeva, I. V. [Progressive polyploidy in mouse liver following repeated hepatectomy]. *Tsitologia* **17**, 909–916 (1975).
159. Gerlyng, P. et al. Binucleation and polyploidization patterns in developmental and regenerative rat liver growth. *Cell Prolif.* **26**, 557–565 (1993).
160. Sigal, S. H. et al. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am. J. Physiol.* **276**, G1260–G1272 (1999).
161. Maillet, V. et al. LKB1 as a gatekeeper of hepatocyte proliferation and genomic integrity during liver regeneration. *Cell Rep.* **22**, 1994–2005 (2018).
162. Madra, S., Styles, J. & Smith, A. G. Perturbation of hepatocyte nuclear populations induced by iron and polychlorinated biphenyls in C57BL/10ScSn mice during carcinogenesis. *Carcinogenesis* **16**, 719–727 (1995).
163. Muramatsu, Y. et al. Increased polyploid incidence is associated with abnormal copper accumulation in the liver of LEC mutant rat. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **107**, 129–136 (2000).
164. Yamada, T. et al. Increased polyploidy, delayed mitosis and reduced protein phosphatase-1 activity associated with excess copper in the Long Evans Cinnamon rat. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **99**, 283–304 (1998).
165. Lazzarini Denchi, E., Celli, G. & de Lange, T. Hepatocytes with extensive telomere deprotection and fusion remain viable and regenerate liver mass through endoreplication. *Genes Dev.* **20**, 2648–2653 (2006).
166. Ahodontin, J. et al. Hepatitis B virus X protein promotes DNA damage propagation through disruption of liver polyploidization and enhances hepatocellular carcinoma initiation. *Oncogene* **38**, 2645–2657 (2019).
167. Gentric, G. & Desdouets, C. Liver polyploidy: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Oncotarget* **6**, 8430–8431 (2015).
168. Schmucker, D. L. Do hepatocytes age? *Exp. Gerontol.* **25**, 405–412 (1990).
169. Schmucker, D. L. Hepatocyte fine structure during maturation and senescence. *J. Electron. Microscop. Tech.* **14**, 106–125 (1990).
170. Asahina, K. et al. Multiplicative mononuclear small hepatocytes in adult rat liver: their isolation as a homogeneous population and localization to periportal zone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 1160–1167 (2006).
171. Knouse, K. A., Lopez, K. E., Bachofner, M. & Amon, A. Chromosome segregation fidelity in epithelia requires tissue architecture. *Cell* **175**, 200–211.e13 (2018).
172. Overturf, K., Al-Dhalimy, M., Finegold, M. & Grompe, M. The repopulation potential of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion. *Am. J. Pathol.* **155**, 2135–2145 (1999).
173. Ganem, N. J. et al. Cytokinesis failure triggers hippo tumor suppressor pathway activation. *Cell* **158**, 833–848 (2014).
174. Wang, M. J., Chen, F., Lau, J. T. Y. & Hu, Y. P. Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes. *Cell Death Dis.* **8**, e2805 (2017).
175. Wang, M. J. et al. Reversal of hepatocyte senescence after continuous in vivo cell proliferation. *Hepatology* **60**, 349–361 (2014).

176. Schoenfelder, K. P. & Fox, D. T. The expanding implications of polyploidy. *J. Cell Biol.* **209**, 485–491 (2015).
177. Rios, A. C. et al. Essential role for a novel population of binucleated mammary epithelial cells in lactation. *Nat. Commun.* **7**, 11400 (2016).
178. Tanami, S. et al. Dynamic zonation of liver ploidy. *Cell Tissue Res.* **368**, 405–410 (2017).
179. Coate, J. E. & Doyle, J. J. Quantifying whole transcriptome size, a prerequisite for understanding transcriptome evolution across species: an example from a plant allopolyploid. *Genome Biol. Evol.* **2**, 534–546 (2010).
180. Miettinen, T. P. et al. Identification of transcriptional and metabolic programs related to mammalian cell size. *Curr. Biol.* **24**, 598–608 (2014).
181. Lu, P. et al. Microarray analysis of gene expression of mouse hepatocytes of different ploidy. *Mamm. Genome* **18**, 617–626 (2007).
182. Kreutz, C. et al. Hepatocyte ploidy is a diversity factor for liver homeostasis. *Front. Physiol.* **8**, 862 (2017).
183. Anatskaya, O. V. & Vinogradov, A. E. Genome multiplication as adaptation to tissue survival: evidence from gene expression in mammalian heart and liver. *Genomics* **89**, 70–80 (2007).
184. Anatskaya, O. V. & Vinogradov, A. E. Somatic polyploidy promotes cell function under stress and energy depletion: evidence from tissue-specific mammal transcriptome. *Funct. Integr. Genomics* **10**, 433–446 (2010).
185. Bahar Halpern, K. et al. Bursty gene expression in the intact mammalian liver. *Mol. Cell* **58**, 147–156 (2015).
186. Eldar, A. & Elowitz, M. B. Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature* **467**, 167–173 (2010).
187. Knouse, K. A., Wu, J., Whitaker, C. A. & Amon, A. Single cell sequencing reveals low levels of aneuploidy across mammalian tissues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 13409–13414 (2014).
188. McConnell, M. J. et al. Mosaic copy number variation in human neurons. *Science* **342**, 632–637 (2013).
189. Weier, J. F. et al. Human cytotrophoblasts acquire aneuploidies as they differentiate to an invasive phenotype. *Dev. Biol.* **279**, 420–432 (2005).
190. Westra, J. W. et al. Aneuploid mosaicism in the developing and adult cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* **507**, 1944–1951 (2008).
191. Duncan, A. W. et al. Aneuploidy as a mechanism for stress-induced liver adaptation. *J. Clin. Invest.* **122**, 3507–3515 (2012).
192. Matsumoto, T., Wakefield, L., Tarlow, B. D. & Grompe, M. In vivo lineage tracing of polyploid hepatocytes reveals extensive proliferation during liver regeneration. *Cell Stem Cell* **26**, 34–47 (2019).
193. Grompe, M. & al-Dhalimy, M. Rapid nonradioactive assay for the detection of the common French Canadian tyrosinemia type I mutation. *Hum. Mutat.* **5**, 105 (1995).
194. Wilkinson, P. D. et al. Polyploid hepatocytes facilitate adaptation and regeneration to chronic liver injury. *Am. J. Pathol.* **189**, 1241–1255 (2019).
195. Losick, V. P., Fox, D. T. & Spradling, A. C. Polyploidization and cell fusion contribute to wound healing in the adult *Drosophila* epithelium. *Curr. Biol.* **23**, 2224–2232 (2013).
196. Losick, V. P. Wound-induced polyploidy is required for tissue repair. *Adv. Wound Care* **5**, 271–278 (2016).
197. Zhang, S. et al. The polyploid state plays a tumor-suppressive role in the liver. *Dev. Cell* **47**, 390 (2018).
198. Sato, N. et al. Centrosome abnormalities in pancreatic ductal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **5**, 963–970 (1999).
199. Lothschütz, D. et al. Polyploidization and centrosome hyperamplification in inflammatory bronchi. *Inflamm. Res.* **51**, 416–422 (2002).
200. Hamada, S., Itoh, R. & Fujita, S. DNA distribution pattern of the so-called severe dysplasias and small carcinomas of the colon and rectum and its possible significance in the tumor progression. *Cancer* **61**, 1555–1562 (1988).
201. Montgomery, B. T. et al. Stage B prostate adenocarcinoma. Flow cytometric nuclear DNA ploidy analysis. *Arch. Surg.* **125**, 327–331 (1990).
202. Bielski, C. M. et al. Genome doubling shapes the evolution and prognosis of advanced cancers. *Nat. Genet.* **50**, 1189–1195 (2018).
203. Dewhurst, S. M. et al. Tolerance of whole-genome doubling propagates chromosomal instability and accelerates cancer genome evolution. *Cancer Discov.* **4**, 175–185 (2014).
204. Galipeau, P. C. et al. 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 7081–7084 (1996).
205. Maley, C. C. et al. Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nat. Genet.* **38**, 469–473 (2006).
206. Kneissig, M., Bernhard, S. & Storchova, Z. Modelling chromosome structural and copy number changes to understand cancer genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **54**, 25–32 (2019).
207. Tanaka, K. et al. Tetraploidy in cancer and its possible link to aging. *Cancer Sci.* **109**, 2632–2640 (2018).
208. Bloy, N. et al. Immunogenic stress and death of cancer cells: contribution of antigenicity vs adjuvanticity to immunosurveillance. *Immunol. Rev.* **280**, 165–174 (2017).
209. Senovilla, L. et al. An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. *Science* **337**, 1678–1684 (2012).
210. Acebes-Huerta, A. et al. Drug-induced hyperploidy stimulates an antitumor NK cell response mediated by NKG2D and DNAM-1 receptors. *Oncimmunology* **5**, e1074378 (2016).
211. Aranda, F. et al. Immune effectors responsible for the elimination of hyperploidy cancer cells. *Oncimmunology* **7**, e1463947 (2018).
212. Cosenza, M. R. & Kramer, A. Centrosome amplification, chromosomal instability and cancer: mechanistic, clinical and therapeutic issues. *Chromosome Res.* **24**, 105–126 (2016).
213. Ganem, N. J., Godinho, S. A. & Pellman, D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* **460**, 278–282 (2009).
214. Wangsa, D. et al. Near-tetraploid cancer cells show chromosome instability triggered by replication stress and exhibit enhanced invasiveness. *FASEB J.* **32**, 3502–3517 (2018).
215. Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J. & Swanton, C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* **501**, 338–345 (2013).
216. Lv, L. et al. Tetraploid cells from cytokinesis failure induce aneuploidy and spontaneous transformation of mouse ovarian surface epithelial cells. *Cell Cycle* **11**, 2864–2875 (2012).
217. Zhang, S., Lin, Y. H., Tarlow, B. & Zhu, H. The origins and functions of hepatic polyploidy. *Cell Cycle* **18**, 1302–1315 (2019).
218. Austin, L. S., Kaushansky, A. & Kappe, S. H. Susceptibility to *Plasmodium* liver stage infection is altered by hepatocyte polyploidy. *Cell Microbiol.* **16**, 784–795 (2014).

Acknowledgements

The authors are supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), la Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM: EQU201903007824), the Institut National du Cancer (PRTC-2017, PLBIO18-107), the Agence Nationale de Recherche ANR (ANR-16-CE14), Fondation ARC (Association de Recherche sur le Cancer), Ligue Contre le Cancer (comité de Paris), the Cancéropôle Ile-de-France (Emergence 2015), The Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF-SUBV 2017), EVA-Plan Cancer INSERM HTE and the SIRIC CARPEM. R.D. is a recipient of Fondation pour la Recherche Médicale (PhD grant). P.C. is a recipient of Plan Cancer INSERM (program « Soutien pour la formation à la recherche fondamentale et translationnelle en cancérologie »).

Author contributions

R.D., M.S.-A. and P.C. wrote the article and researched data for the article. S.C.-M. wrote the article and made a substantial contribution to the discussion of content. C.D. wrote the article, researched data for the article, made a substantial contribution to the discussion of content and reviewed/edited the manuscript before submission.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Peer review information

Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology thanks A. Duncan, S. Itzkovitz and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© Springer Nature Limited 2020

Cellular and Molecular Mechanisms Controlling Ploidy

Romain Donné, Myriam B Nader, and Chantal Desdouets, The National Institute of Health and Medical Research, Paris, France; National Scientific Research Center, Paris, France; and Paris Descartes University, Paris, France

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Glossary

Aneuploidy Refers to a cell having an incomplete set of chromosomes.

Cytokinesis Division of the cytoplasm into two daughter cells. It occurs in the final step of cell division.

Diploid Refers to a cell having two sets of homologous chromosomes.

DNA replication A process allowing the production of two identical replicas of DNA from one original DNA molecule.

Karyokinesis Division of the nucleus into two daughter nuclei during the cell cycle.

Kinetochores A complex of proteins in the centromeric region of a chromosome connecting to spindle fibers.

Oncogene A gene that encodes a protein able to transform a normal cell into a cancerous one. Oncogenes are often mutated and/or highly expressed in tumor cells.

Polyploid Refers to a cell or an organism having more than two complete sets of chromosomes (Triploid (3n), Tetraploid (4n), octoploid (8n), ...).

Telomere A region of repetitive DNA localized at the end of chromosomes. Telomeres protect chromosomes from degradation or fusion with other neighboring chromosomes.

Transcription factor A protein regulating the level of gene expression.

Transformation or malignant transformation A process by which a cell acquires cancer properties.

Tumor-suppressor gene A gene that encodes a protein able to protect normal cells from malignant transformation. Tumor-suppressor genes are often mutated or expressed at low-levels in tumor cells, in order to turn-off their protective function.

Introduction

Every species has a specific number of chromosomes (n). For example, humans (*Homo sapiens*) have 23 pairs of chromosomes ($n=23$) while mice (*Mus musculus*) have 20. In general, mammals contain two complete sets of homologous chromosomes (diploid, $2n$), the diploid state being the standard for sexually reproducing species. Polyploidy is a state with an additional set (s) of complete chromosomes (e.g., four sets of chromosomes – Tetraploid ($4n$); eight sets – Octoploid ($8n$);...) (Otto and Whitton, 2000). Polyploid cells are found in physiological mammal organs like heart (cardiomyocytes), blood (megakaryocytes), liver (hepatocytes), associated with the normal development of the tissues (Celton-Morizur *et al.*, 2009; Davoli and de Lange, 2011). Importantly, polyploid cells can also emerge in diploid tissues under pathological conditions such as virus infections and tumorigenesis (Davoli and de Lange, 2011; Ganem *et al.*, 2007; Centric and Desdouets, 2014). Accordingly, unscheduled tetraploidy is found in human cancers (e.g., colorectal, breast, and cervical tumors) and constitutes an unstable status between diploidy and aneuploidy. Recent progress has unraveled the mechanisms by which polyploid cells emerge in physiological and pathological conditions.

Cell Cycle Progression and Control

Most cell types stop dividing in adult organisms where they stay in a quiescent phase named G0. These cells mostly divide in the growth period of life by a crucial process called cellular division. By this process, a mother cell gives birth to two daughter cells, allowing organs to constantly renew themselves and replace the damaged and dead cells. The cell cycle is composed of two essential steps: The interphase where duplication of genomic material (chromosomes) occurs, and mitosis where separation of chromosomes between the two daughter cells takes place. Interphase is subdivided into three phases, which occur in the following order (Fig. 1(A)): G1, S and G2. During G1 (gap 1), the cell is metabolically active and continuously growing but does not replicate its DNA. G1 is followed by S phase (synthesis), during which DNA replication takes place (replicated chromosomes). The completion of DNA synthesis is followed by the G2 phase (gap 2), during which cell growth continues and proteins are synthesized in preparation for mitosis. Mitosis is sub-divided into four steps: Prophase, Metaphase, Anaphase and Telophase. During mitosis, replicated chromosomes are attached to a mitotic spindle that aligns them and allows the separation of sister chromatids to produce an even partitioning of the genetic material (karyokinesis). This process is followed by a separation of the cell cytoplasm (cytokinesis) giving birth to two daughter cells.

Cell cycle is precisely coordinated, where no phase can start before the end of the last one to ensure the integrity of the diploid genome (Malumbres and Barbacid, 2009; Norbury and Nurse, 1992). Importantly, cell cycle must be closely regulated because cells are constantly exposed to exogenous and endogenous genotoxic agents inducing diverse alterations in DNA molecules. In

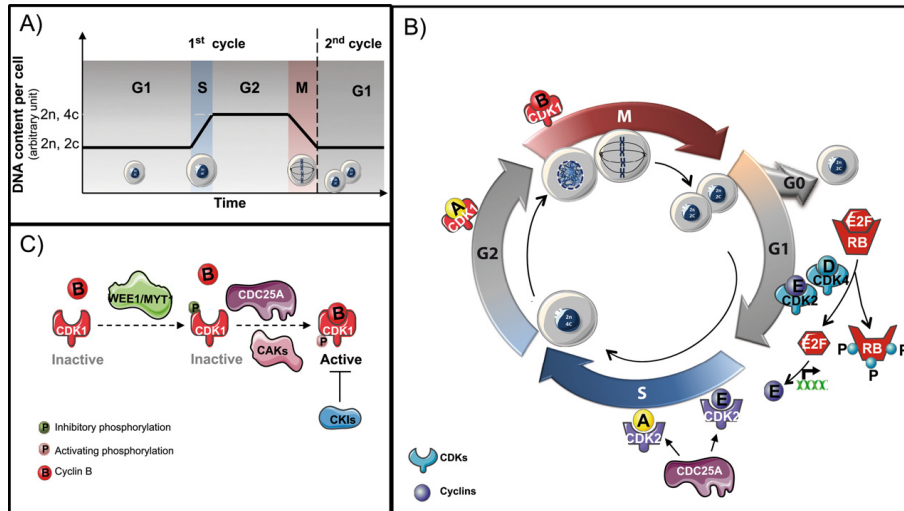


Fig. 1 Cell cycle progression. (A) cell cycle is divided into four phases: G₁, S, G₂, and M. Cells in G₁ are diploid and their DNA content is referred to as 2n. In S phase DNA replication occurs increasing the DNA content to 4n. DNA content remains at 4n in G₂ and decreases again to 2n during mitosis. (B) CDK/cyclin complexes regulate progression through cell cycle. During G₁ phase, CDK4/cyclin D and CDK2/cyclin E complexes phosphorylate Rb, activating E2F proteins. E2F-responsive genes encode cell cycle regulators essential for G₁/S transition, and enzymes involved in nucleotide biosynthesis that occurs in S phase. During G₂ phase, the cyclin A/CDK1 complex is sequentially phosphorylated allowing the entry in Mitosis which is triggered by cyclin B/CDK1 activation. (C) Inhibitory and activating phosphorylations of CDK1 independently of Cyclins.

mammals, cell cycle is driven by a plethora of proteins especially Cyclin-Dependent Kinases (e.g., CDK1–2–4–6) and Cyclins (e.g., Cyclins A-D-E-B). CDKs are a family of serine/threonine protein kinases (Malumbres and Barbacid, 2009; Norbury and Nurse, 1992). CDK activity depends on the association between its non-catalytic regulatory subunit and Cyclins. CDKs were identified in screens for conditional mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that reversibly arrested the cell cycle at characteristic points. Cyclins were initially named for their periodic accumulation and degradation (cycling) through the early cell cycles of fertilized sea urchin eggs. When activated, Cyclin-CDK complexes govern the progression through the cell cycle from the quiescent stage (G₀), to growth phase (G₁-G₂), through DNA replication (S), and finally to cell division (M). One of the essential roles of Cyclin-CDK complexes is notably the activation of the E2F transcription factor (Nevins, 1992). During G₁, CDK4–6/cyclin D and CDK2/Cyclin E complexes sequentially phosphorylate Retinoblastoma protein (RB), leading to the activation of E2F. E2F-responsive genes encode cell cycle regulators, essential for G₁/S transition (e.g., Cyclin E, Cyclin A), enzymes involved in nucleotide biosynthesis (e.g., thymidine kinase), and key factors of DNA replication machinery (e.g., Cdc6, ORC1) (Fig. 1(B)).

CDKs are not only regulated by their interaction with Cyclins; they also possess inhibitory and activating phosphorylation sites (Pines, 1994). At the beginning of CDK1 expression, inhibitory kinases (Wee1 and Myt1) phosphorylate at threonine 14 (T14) and tyrosine 15 (Y15) within the ATP-binding site interfering with proper ATP alignment. Later, CDC25A Phosphatase turns on the activity of CDK1 by dephosphorylating these inhibitory phosphorylations, and CDK-activating kinases (CAKs) improve substrate binding (CyclinB) by T-loop phosphorylation at threonine 161 (T161) by (Fig. 1(C)). Moreover, there is a supplemental system that turns off the activity of CDK: CDK inhibitors (CKIs) (Toyoshima and Hunter, 1994). CKIs control CDK activity by two families of inhibitors: INK4 proteins (p16(INK4a), p15(INK4b), p18(INK4c), and p19(INK4d)) and Cip/Kip family (p21, p27 and p57). INK4 proteins block the progression of the cell cycle by binding to either CDK4 or CDK6 and inhibit the action of Cyclin D whereas Cip/Kip family interact with different Cyclin/CDKs and thus control the different phases of the cell cycle.

Causes of Whole Chromosome Duplication: Polyploidization

How does a diploid cell become polyploid? In a physiological or pathological context, there is a number of mechanisms that promote the genesis of polyploid cells: Eendoreplication, mitotic slippage, cytokinesis failure and cell fusion (Fig. 2). The various mechanisms are described below.

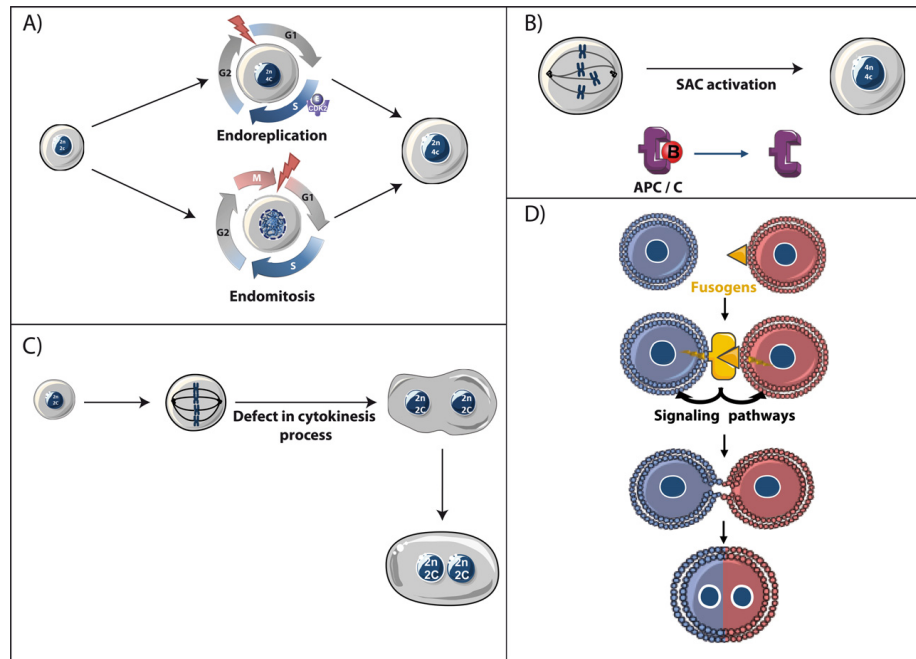


Fig. 2 Mechanisms of polyploidisation. Polyploid cells can be generated by (A) endoreplication, (B) mitotic slippage, (C) cytokinesis failure, or (D) cell fusions. Although cytokinesis failure and cell fusion generate binuclear contingents, endoreplication and mitotic slippage produce mononuclear cells.

Endoreplication

Endoreplication is a specific cell cycle defect involving a switch from mitotic cell cycle to endocycle (Fig. 2(A); Fox and Duronio, 2013). This allows the replication of the nuclear genome with neither karyokinesis nor cytokinesis leading to the generation of mononucleate polyploid contingents. Interestingly two variants of endoreplication were described (Fig. 2(A)): Endocycling and Endomitosis. During endocycling, the cell alternates G and S phases, whereas in endomitosis, the cell presents features of mitosis such as chromosome condensation but skips cytokinesis. Classically, to carry out G and S phases alternation, there is a cyclic activation/inhibition of CDK2/Cyclin E, and to escape mitosis, CDK1/Cyclin B1 has to be inhibited (Fox and Duronio, 2013). Endoreplication has been extensively characterized during embryogenesis in different organisms. In mouse, during the implantation of blastocysts, trophoblast giant cells (TGC) perform endoreplication cycles and accumulate DNA up to 1000 sets of chromosomes. This endoreplication is triggered by p57 (CKI)-mediated inhibition of CDK1 activity (Ullah *et al.*, 2008). Megakaryocytes (MKC) are another example of developmentally regulated polyploidization in mammals. Whereas TGC skip mitosis, MKC become polyploid by endomitosis (skip a part of anaphase and telophase). It has been shown that down-regulation of the guanidine exchange factor ECT2 prevents RhoA activation and cleavage furrow ingression which is coupled with a decrease in cyclin B1 expression (Gao *et al.*, 2012; Nguyen and Ravid, 2010). After many rounds of this cell cycle defect, MKC reach a polyploid state (with 128n chromosomes) important for platelet formation (Raslova *et al.*, 2007). Interestingly, endoreplication cycles are also found in pathological settings under the activation of the DNA Damage Response (DDR) blocking cells in G₂/M and protecting the tissue from the proliferation of damaged cells holding chromosomal instabilities. This process has been described in hepatic disorders during division of steatotic hepatocytes (Gentric *et al.*, 2015). Other studies have demonstrated that endoreplication can promote aneuploidy and tumorigenesis; telomere crisis in fibroblasts leads to telomere shortening and mitosis failure. Thereafter, reactivation of telomerase induces the expansion of clones and their transformation (Davoli and de Lange, 2012).

Mitotic Slippage

The progression from Metaphase to Anaphase requires the alignment of all chromosomes to the metaphase plate. The spindle assembly checkpoint (SAC) ensures proper chromosome segregation by delaying anaphase onset in response to unattached

kinetochores. During mitotic slippage, cells present an altered Spindle-Assembly-Checkpoint (SAC) and exit mitosis without undergoing anaphase or cytokinesis (Fig. 2(B)) generating mononucleate polyploid cells. Interestingly, polyploidization induced by mitotic slippage has never been demonstrated in a physiological context, but alterations in the integrity of SAC or a defect expression of SAC components have been found in some chromosomally unstable cancers (Kops *et al.*, 2005). Accordingly, the best-described example of Mitotic Slippage is found during colorectal tumorigenesis related to *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) gene mutation. APC mutation is the most frequent mutation found in human colorectal tumors, contributing to the genetic instability required for the progression from benign polyp to aggressive carcinoma. APC associates with mitotic spindle microtubules, most notably at the plus ends of the microtubules, which interact with kinetochores (Caldwell and Kaplan, 2009). Both RNA interference-mediated depletion in cultured cells and conditional knockout of APC in vivo induce mitotic slippage linked to the genesis of a mononucleate tetraploid contingent (Dikovskaya *et al.*, 2007). Mitotic slippage has also been observed in cells after prolonged mitotic arrest in response to spindle toxins. Drugs that target microtubule dynamics (e.g., taxanes, vinca alkaloids, and epothilones) are active against a broad range of cancers, activating the SAC. After many hours of SAC induction, cells either exit mitosis by slippage leading to the genesis of polyploid progenies (Andreassen and Margolis, 1994; Cheng and Crasta, 2017; Lee *et al.*, 2010) or die during mitotic catastrophe. This mechanism is a result of chromosomal missegregation or the persistence of lagging chromosomes, and acts as an oncosuppressive mechanism avoiding genomic instability (Galluzzi *et al.*, 2018; Vitale *et al.*, 2011). Moreover, mitotic catastrophe is also mediated in cells lacking TP53 where multipolar divisions of tetraploid cells are allowed, leading to the generation of aneuploid cells genomically unstable.

Cytokinesis Failure

Cytokinesis occurs in the last step of cell division when the ingressive cleavage furrow begins the partition of the cytoplasm between the daughter cells. This process is associated to a developmental program highly regulated and requires a coordinate interplay between cell cycle regulators, chromosomes, lipids and membrane trafficking factors. In fact, to induce correct cytokinesis, four events must be followed: (1) The recruitment of RhoA GTPase at the cleavage plane, (2) Cleavage furrow ingression with actomyosin and myosin, (3) Midbody formation and (4) Midbody abscission. Any interference in the progression of these steps can induce cytokinesis failure and the genesis of binuclear tetraploid cells (Pandit *et al.*, 2013).

Interestingly, in several normal tissues, cytokinesis failure is a physiological process. After birth, ventricular cardiomyocytes respond to an amplification of blood flow by an adaptive increase in volume of the heart (hypertrophy). In this system, a drastic reduction of RhoA and its effector ROCK account for defects in the process of cytokinesis. Indeed, in some diploid cardiomyocytes, a cytokinetic ring is formed but as it is not functional, cytokinesis is never achieved, and tetraploid binucleated cell is consequently generated (Abuja *et al.*, 2007). This defect is also conducted by the expression of the orphan cyclin G1, that fixes none of the CDK (Liu *et al.*, 2010). Another example of polyploidization involving cytokinesis failure occurs in hepatocytes. During the weaning period, in liver parenchyma, diploid hepatocytes can get into normal cell division cycle giving rise to two diploid hepatocytes or follow a scheduled division program characterized by cytokinesis failure. In that case, diploid hepatocytes undergo mitosis, but do not form a contractile ring. Indeed, cleavage-plane specification is never established, because of the deficiencies of actin cytoskeleton reorganization (Celton-Morizur *et al.*, 2009; Margall-Ducos *et al.*, 2007). Alarmingly, cytokinesis failure could be a pathological process leading to the genesis of unstable aneuploid cells undergoing malignant transformation. For example, during Fanconi anemia's pathology, characterized by bone marrow failure and cancer predisposition, hematopoietic cells deficient for FANCA protein undergo cytokinesis failure induced by ultrafine DNA bridges (Vinciguerra *et al.*, 2010). These cells can either trigger an apoptotic program leading to their depletion or bypass it, and become responsible of cancer susceptibility.

Cell-Cell Fusion

The cell-cell fusion mechanism is the only process leading to polyploidy without implicating a cell cycle defect. By this mechanism, membrane merge and cytoplasm mix leading to the genesis of mostly multinuclear cells (Fig. 2(D)). Many species (e.g., yeast, nematodes, mammals) and cell types (gametes, epithelia, myoblasts and macrophages) carry out physiological cell-cell fusion to maintain tissue homeostasis. The well-known mechanism is the haploid yeast fusion between two mating type (Mata and Matz) (Hartwell, 1980). Other mechanisms (gamete fusion, myoblast fusion and macrophage fusion) are still poorly understood. Although no universal mechanism exists, but fusing cells have to recognize themselves, attach and finally fuse. Accordingly, there is a specific molecular control with a set of proteins that are specific to each fusing cell type and each membrane type (Chen *et al.*, 2007). First, cells that are destined to fuse send-off signals to enter in "fusion competence" state. In the next step, adhesive interactions between plasma membrane proteins called "fusogens" take place. Finally, the interaction between the two receptors engage signaling pathways in order to trigger fusion with cytoskeleton modifications (Aguilar *et al.*, 2013).

Importantly, some viruses have the ability to fuse cells (e.g., Human papillomavirus (HPV)), Epstein-Barr virus (EBV) (Abou-Elhamd and Habib, 2007; Olaharski *et al.*, 2006). These viruses express fusogenic proteins, which are able to fuse cells by two mechanisms leading to heterokaryon (multinuclear cells produced by fusion of different cells). (1) Virus infection allows the expression of fusogenic proteins at the plasma membrane of the infected cell. This cell can fuse to any other cell having receptors for fusion proteins. (2) Fusion is mediated by viral particle without infection. This heterokaryon can enter in mitosis and

consequently generates hybrid mononucleate cells or remain quiescent. Finally, viruses play an important role in tetraploid cell formation and cancers. For example, HPV infection is clearly a risk factor for the development of cervical cancer, which is characterized by the presence of tetraploid cervical cells (Gao and Zheng, 2011).

Conclusion

Polyploidization, the acquisition of a complete set of chromosomes, is a dramatic change occurring in the genome. This process is well tolerated in many eukaryotic cells and represents a physiological process linked to the differentiation and modulation of the activity of tissues. However, in a pathological context, the combination of two genomes into a single cell can induce chromosomal instability, aberrant gene expression, epigenetic dysregulations and acquisition of novel cellular behaviors that can potentiate tumor aggressiveness. It is important to note that different mechanisms have evolved to block the proliferation of polyploid contingent. Thus, polyploid cells can be arrested in the G1 phase of the cell cycle following the activation of the tetraploid checkpoint. This will prevent genomic instability, aneuploidy and tumorigenesis in certain context (Fujiwara *et al.*, 2005).

This review shined the light on molecular and cellular mechanisms occurring during unconventional cell cycles and cell-cell fusion events leading to the genesis of polyploid cells. Further studies are necessary and might help in the future to fully understand the role of polyploidization in both physiological and pathological contexts.

References

- Abou-Elhamd, K.-E.A., Habib, T.N., 2007. The flow cytometric analysis of premalignant and malignant lesions in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 43, 366–372.
- Aguilar, P.S., Bayliss, M.K., Fleissner, A., *et al.*, 2013. Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms. *Trends Genet.* 29, 427–437.
- Ahuja, P., Perrard, E., Pedrazzini, T., *et al.*, 2007. Re-expression of proteins involved in cytokinesis during cardiac hypertrophy. *Exp. Cell Res.* 313, 1270–1283.
- Andreassen, P.R., Margolis, R.L., 1994. Microtubule dependency of p34cdc2 inactivation and mitotic exit in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 127, 789–802.
- Caldwell, C.M., Kaplan, K.B., 2009. The role of APC in mitosis and in chromosome instability. *Adv. Exp. Med. Biol.* 656, 51–64.
- Celton-Morizur, S., Merlen, G., Coulon, D., Margall-Ducos, G., Desdouets, C., 2009. The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. *J. Clin. Investig.* 119, 1880–1887.
- Cheng, B., Crasta, K., 2017. Consequences of mitotic slippage for antimicrotubule drug therapy. *Endocr. Relat. Cancer* 24, T97–T106.
- Chen, E.H., Grote, E., Mohler, W., Vignery, A., 2007. Cell–cell fusion. *FEBS Lett.* 581, 2181–2193.
- Davoli, T., de Lange, T., 2011. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 585–610.
- Davoli, T., de Lange, T., 2012. Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. *Cancer Cell* 21, 765–776.
- Dikovskaya, D., Schiffmann, D., Newton, I.P., *et al.*, 2007. Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J. Cell Biol.* 178, 183–195.
- Fox, D.T., Duronio, R.J., 2013. Endoreplication and polyploidy: Insights into development and disease. *Development* 140, 3–12.
- Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., *et al.*, 2005. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 437, 1043–1047.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., *et al.*, 2018. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death Differ.* 25 (3), 486–541.
- Ganem, N.J., Storchova, Z., Pellman, D., 2007. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 157–162.
- Gao, Y., Smith, E., Ker, E., *et al.*, 2012. Role of RhoA specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes. *Dev. Cell* 22, 573–584.
- Gao, P., Zheng, J., 2011. Oncogenic virus-mediated cell fusion: New insights into initiation and progression of oncogenic viruses-related cancers. *Cancer Lett.* 303, 1–8.
- Genric, G., Desdouets, C., 2014. Polyploidization in liver tissue. *Am. J. Pathol.* 184, 322–331.
- Genric, G., Maillet, V., Paradis, V., *et al.*, 2015. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Investig.* 125, 981–992.
- Hartwell, L.H., 1980. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* unresponsive to cell division control by polypeptide mating hormone. *J. Cell Biol.* 85, 811–822.
- Kops, G.J.P.L., Weaver, B.A.A., Cleveland, D.W., 2005. On the road to cancer: Aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer* 5, 773–785.
- Lee, J., Kim, J.A., Margolis, R.L., Fotadar, R., 2010. Substrate degradation by the anaphase promoting complex occurs during mitotic slippage. *Cell Cycle* 9, 1792–1801.
- Liu, Z., Yue, S., Chen, X., Kubin, T., Braun, T., 2010. Regulation of cardiomyocyte polyploidy and multinucleation by CyclinG1. *Circ. Res.* 106, 1498–1506.
- Malumbres, M., Barbacid, M., 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* 9, 153–166.
- Margall-Ducos, G., Celton-Morizur, S., Coulon, D., Br gerie, O., Desdouets, C., 2007. Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. *J. Cell. Sci.* 120, 3633–3639.
- Neuens, J.R., 1992. Transcriptional regulation. A closer look at E2F. *Nature* 358, 375–376.
- Nguyen, H.G., Ravid, K., 2010. Polyploidy: Mechanisms and cancer promotion in hematopoietic and other cells. In: Poon, R.Y.C. (Ed.), *Polyploidization and Cancer* 675. New York: Springer, pp. 105–122.
- Norbury, C., Nurse, P., 1992. Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 441–470.
- Olaharski, A.J., Sotelo, R., Solorza-Luna, G., *et al.*, 2006. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis* 27, 337–343.
- Otto, S.P., Whittton, J., 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 34, 401–437.
- Pandit, S.K., Westendorp, B., de Bruin, A., 2013. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends Cell Biol.* 23, 556–566.
- Pines, J., 1994. The cell cycle kinases. *Semin. Cancer Biol.* 5, 305–313.
- Raslova, H., Kaufmann, A., Sekkat, D., *et al.*, 2007. Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: A gene profiling approach. *Blood* 109, 3225–3234.
- Toyoshima, H., Hunter, T., 1994. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67–74.
- Ullah, Z., Kohn, M.J., Yagi, R., Vassilev, L.T., DePamphilis, M.L., 2008. Differentiation of trophoblast stem cells into giant cells is triggered by p57/Kip2 inhibition of CDK1 activity. *Genes Dev.* 22, 3024–3036.
- Vinciguerra, P., Godinho, S.A., Parmar, K., Pellman, D., D'Andrea, A.D., 2010. Cytokinesis failure occurs in Fanconi anemia pathway-deficient murine and human bone marrow hematopoietic cells. *J. Clin. Investig.* 120, 3834–3842.
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., Kroemer, G., 2011. Mitotic catastrophe: A mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 385–392.

La polyplôidie hépatique

Dr Jekyll ou Mr Hyde

Romain Donné, Maëva Saroul, Vanessa Maillet, Séverine Celton-Morizur, Chantal Desdouets

> La polyplôidie (amplification du génome entier) fait référence à des organismes dont les cellules ont plus de deux jeux complets de chromosomes homologues. La polyplôidie a été observée pour la première fois chez les plantes, il y a plus d'un siècle. Il est dorénavant connu que ce processus se produit chez de nombreux eucaryotes dans diverses circonstances. Chez les mammifères, le développement de cellules polyplôides peut contribuer à la différenciation des tissus. Il peut donc présenter un gain de fonction. Alternativement, il peut être associé au développement de différentes pathologies comme le cancer. Il existe différents mécanismes qui favorisent la genèse des cellules polyplôides, dont la fusion cellulaire ou une division cellulaire anormale. Chez les mammifères, la polyplôidie est une des caractéristiques des cellules hépatiques. La polyplôidisation survient en effet principalement au cours du développement du parenchyme hépatique, mais également chez l'adulte, à la suite de différents stress. Des progrès récents ont permis de comprendre les mécanismes de polyplôidisation du tissu hépatique et ses conséquences fonctionnelles dans un contexte physiologique et pathologique. ◀



Centre de Recherche des Cordeliers, Inserm, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, équipe Prolifération, Stress and Liver Physiopathology, 15, rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France.
chantal.desdouets@inserm.fr

présentant deux copies (soit $2n$) sont diploïdes, si elles possèdent trois copies (soit $3n$) elles seront dites triploïdes, et pour quatre copies ($4n$), elles seront tétraploïdes, etc. (Figure 1A). La polyplôidie définit donc un patrimoine chromosomique de plus de deux jeux complets de chromosomes [1, 2]. Il est important de noter que le ou les jeux supplémentaires de chromosomes peuvent provenir du même individu (autopolyploïde) ou de l'hybridation de deux espèces différentes (allopolyploïdes). Les variations du nombre de chromosomes peuvent survenir au sein d'un seul et unique noyau définissant la ploïdie nucléaire et permettre l'émergence de populations mononucléées (Figure 1B) [3]. Les cellules multinucléées présentent une répartition du matériel génétique dans deux noyaux ou plus, c'est ce qui caractérise la ploïdie cellulaire (Figure 1B) [3]. Chez les eucaryotes, la polyplôidie n'est pas un phénomène rare. Elle est désormais considérée comme un mode de spéciation commun ayant des conséquences majeures pour l'évolution des plantes, la biodiversité et l'écologie [2, 4]. La polyplôidisation est en effet très fréquente dans le règne végétal [5]. Des cas ont aussi été rapportés chez certains insectes, chez des poissons, des amphibiens ou des reptiles [6]. Chez les mammifères, la polyplôidisation d'un organisme entier est exceptionnelle. Elle entraîne généralement une létalité précoce, des avortements spontanés ou des résorptions embryonnaires [3]. Elle est exceptionnelle, mais pas impossible : le rat viscache (*Tympanoctomys barrerae*) et ses proches parents (comme son cousin *Pipanaoctomys aureus*) sont en effet entièrement tétraploïdes [7] ! Chez les mammifères, l'émergence de cellules polyplôides est associée au développement et à la différenciation de certains tissus. On trouve notamment des cellules polyplôides dans le cœur (cardiomyocytes : $4n$), le placenta (cellules géantes du trophoblaste : $8n$ à $64n$), la moelle osseuse (mégaeryocytes : $16n$ à $128n$) et le foie (hépatocytes : $4n$ à $8n$) [8, 9]. Le processus de polyplôidisation

Où trouve-t-on des cellules polyplôides ?

Chez les eucaryotes, les organismes contiennent généralement dans leurs cellules deux jeux complets de chromosomes homologues, ce qui définit l'état diploïde (soit $2n$ chromosomes). Toutefois, le nombre d'exemplaires de jeu de chromosomes peut varier d'une cellule à l'autre ou d'une espèce à une autre, c'est ce qui définit la ploïdie. Les cellules possédant une seule copie de chaque chromosome (donc n) sont dites haploïdes, celles en

Vignette (Photo © Inserm - Bruno Clément).

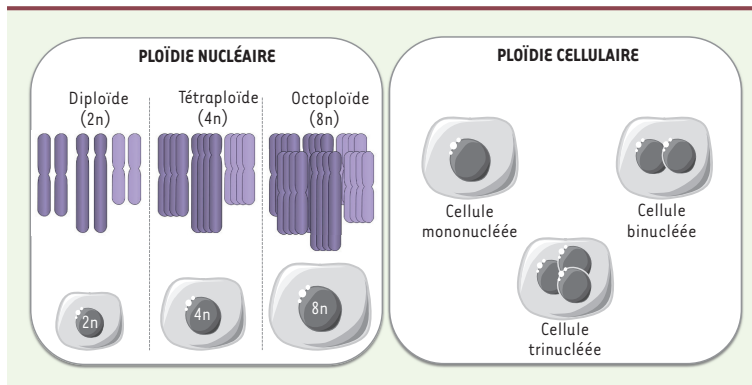


Figure 1. Ploïdie nucléaire et cellulaire. A. Représentation du nombre de copies de chromosomes définissant différents états de la ploïdie nucléaire : diploïde, tétraploïde et octoploïde. B. Représentation de la ploïdie cellulaire discriminant la cellule en fonction du nombre de noyaux : mononucléée, binucléée, trinuéclée.

intervient aussi en réponse à des stress mécanique, métabolique ou génotoxique. Conserver un état polypléide est un véritable défi pour l'organisme. En effet, outre l'augmentation du matériel génétique, la polypléidie est également associée à une amplification du nombre de centrosomes. Lors de la progression des cellules polypléides en mitose, la présence de chromosomes et centrosomes surnuméraires est très souvent associée à des erreurs de ségrégation chromosomique, favorisant la mise en place d'une instabilité chromosomique [10, 11]. De nombreux travaux illustrent d'ailleurs la contribution des intermédiaires polypléides dans le génome des cellules cancéreuses [12, 13].

Comment les cellules deviennent-elles polypléides ?

Dans un contexte physiologique ou pathologique, il existe un certain nombre de mécanismes qui favorisent la genèse des cellules polypléides (Figure 2).

La fusion cellulaire (ou ploïdie cellulaire)

Il s'agit du seul processus conduisant à la polypléidie sans impliquer d'altérations du cycle cellulaire (réplication et division) (Figure 2A). Par ce mécanisme, la fusion de membranes des cellules et le mélange de cytoplasmes conduisent à la génération de cellules majoritairement multinuéclées (sans fusion des noyaux). De nombreuses espèces (comme les levures ou les nématodes) et types de cellules (les gamètes ou les myoblastes) procèdent à une fusion physiologique pour maintenir leur homéostasie [14]. Les infections virales jouent également un rôle important dans la formation de cellules polypléides en induisant la fusion des cellules qu'ils infectent [15]. L'exemple le mieux documenté est l'infection par le virus du papillome humain (VPH) qui est un facteur de risque très élevé dans le développement du cancer du col de l'utérus. L'expression de l'oncoprotéine virale VPH-16 E5 à la surface des cellules épithéliales du col utérin infectées est en effet suffisante pour la formation de cellules binuéclées tétraploïdes [16]. L'expression concomitante des oncoprotéines VPH-16 E6 et VPH-16 E7 induit un état favorable pour la prolifération du contingent de cellules tétraploïdes et, en conséquence, la mise en place d'une instabilité chromosomique [16].

L'endoréplication (ou ploïdie nucléaire)

Ce processus caractérise un cycle cellulaire sans carydiérèse ni cytotdiérèse¹ qui aboutit à la formation d'une cellule polypléide mononucléée (Figure 2B). Les cellules enchaînent des cycles de réplication de l'ADN (phase S) en omettant totalement (endocycle) ou partiellement (endomitose) la mitose [17]. Différents mécanismes d'inhibition de la mitose sont d'ores et déjà connus pour favoriser l'endoréplication [18]. L'un d'eux est la régulation négative de l'activité des complexes cyclines/CDK (*cyclin-dependent kinase*) mitotiques (M-CDK) par protéolyse, via l'ubiquitine ligase E3 APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*), ou par interaction des CDK avec des inhibiteurs (les CKI [*CDK inhibitor*] p21 et p57) [19]. L'oscillation de l'activité du complexe cycline E/CDK2 (de faible à élevée entre les phases G et S) permet aux cellules d'initier des cycles d'endoréplication séquentiels. Ce processus a fait l'objet de nombreuses études chez *Drosophila melanogaster*. Il a notamment été montré que les cellules de la plupart des tissus larvaires, ainsi que de nombreux tissus adultes, se divisent par endoréplication. Chez les mammifères, lors de l'implantation des blastocystes, les cellules géantes du trophoblaste (TGC) effectuent des cycles d'endoréplication et peuvent accumuler jusqu'à 1 000 jeux de chromosomes. Un lien étroit existe entre cycles d'endoréplication et instabilité du génome [19]. Ces mécanismes ont particulièrement été explorés au cours du cycle de division de lignées de cellules transformées présentant des altérations de la réplication de l'ADN (stress de la réplication) ou de l'intégrité des télomères induisant, en phase G2, l'activation du programme de réponse aux dommages de l'ADN (*DNA damage response*, ou DDR) [8]. Lorsque

¹ Division du noyau et partage du cytoplasme.

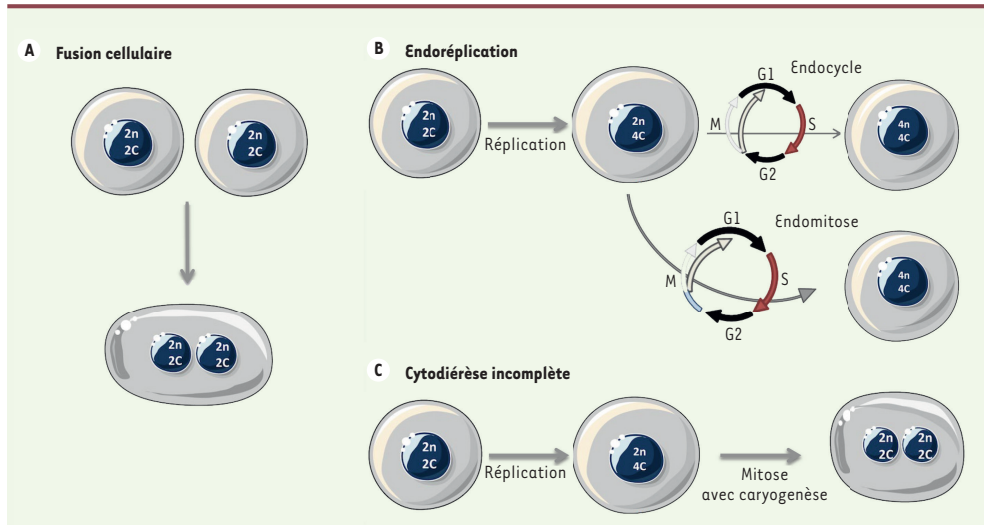


Figure 2. Différents mécanismes de polypléidisation. Les cellules polypléides peuvent être générées par fusion cellulaire (A) ou par modification du cycle de division : endoréplication (B), ou cytotdiérèse incomplète (C). Les mécanismes de fusion cellulaire et de cytotdiérèse incomplète donnent lieu à une descendance binucléée ; l'endoréplication induit la formation d'une cellule mononucléée. « n » fait référence au nombre de chromosomes, « c » au nombre de chromatides.

les dommages sont irréparables, la persistance du DDR induit un arrêt irréversible du cycle cellulaire et la cellule sort de réplication en omettant l'étape de mitose [20].

La cytotdiérèse incomplète (ou ploïdie cellulaire)

Ce mécanisme se traduit par un cycle cellulaire avec caryodiérèse (division du stock chromosomique du noyau en deux lots) mais sans cytotdiérèse (partage du cytoplasme), ce qui aboutit à la formation d'une cellule polypléide binucléée (Figure 2C). Il est admis, depuis des dizaines d'années, que la cytotdiérèse incomplète est un processus physiologique qui participe au développement de certains tissus, comme le cœur [21] et la moelle osseuse [22]. Si nous prenons l'exemple du tissu cardiaque, après la naissance, les cardiomyocytes ventriculaires répondent à une amplification du flux sanguin par une augmentation adaptative du volume (hypertrophie). Ce passage de l'hyperplasie à l'hypertrophie est clairement associé à une polypléidisation. La cycline G1 a été identifiée comme un acteur important de la machinerie moléculaire contrôlant ce processus. Son expression dans les cardiomyocytes néonataux favorise la transition du cycle cellulaire G1/S mais inhibe la cytotdiérèse, favorisant ainsi la binucléation des cellules [23]. Une altération de l'expression et/ou de la localisation de protéines contrôlant la formation et la contraction de l'anneau d'actino-myosine (les petites GTPases : RhoA, Cdc42, Rac1 ; les kinases ROCK [*Rho-associated coiled-coil containing protein kinase*]-I et -II ; et l'anilline) est également observée [24, 25]. Le mécanisme de cytotdiérèse incomplète associé à la génération de contingents de cellules

polypléides a aussi été rapporté dans de nombreuses pathologies, notamment le syndrome de Wiskott-Aldrich, la neutropénie liée à l'X, l'anémie de Fanconi, le syndrome de Lowe, la neurofibromatose de type II ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) [26].

Les cellules polypléides ont-elles une fonction spécifique ?

Déterminer la fonction spécifique des cellules polypléides est un défi majeur. Dans différents tissus de mammifères, la polypléidie a été reliée à une modification du génome, de l'épigénome, du transcriptome et du métabolome [27]. Différents avantages ont été associés au statut de polypléidie, tels que la résistance à l'apoptose, la modification du métabolisme ou la réparation des tissus [17]. Cao *et al.* ont récemment démontré, dans une étude très élégante réalisée chez le poisson zèbre, le bénéfice pour un tissu d'être polypléide [28]. Leurs travaux montrent en effet qu'à la suite de la résection d'une partie de l'épicarde², le processus de régénération induit la prolifération de deux populations cellulaires : des cellules polypléides, au plus proche de la lésion (les cellules « leader »), et

² L'épicarde tapisse l'extérieur du cœur.

des cellules diploïdes, plus éloignées de la lésion (les cellules « *fol-lower* »). Les cellules polyploïdes sont formées par cytotidérèse incomplète induite par une tension mécanique accrue. Elles sont essentielles au processus de régénération et, en fin de processus, elles sont éliminées par apoptose, ce qui suggère une fonction spécifique de ces cellules pour la régénération de l'épicarde lésé. Un bénéfice similaire a également été démontré dans le tissu rénal dans lequel les cellules polyploïdes sont générées par endocycle et permettent le maintien de la fonction du rein [29]. Citons enfin l'avantage pour le tissu de la glande mammaire murine de contenir des contingents de cellules polyploïdes. Dans ce tissu, les cellules alvéolaires devenues binucléées par un cycle de division sans cytotidérèse ont été identifiées comme des « super productrices de lait » [30].

La poursuite des recherches sur le rôle de la polyploïdie dans les fonctions tissulaires devrait révéler la polyvalence de ces cellules et renforcer les données déjà publiées sur le rôle de ces cellules notamment dans la croissance, la régénération et les fonctions vitales.

Le foie : la polyploïdie dans tous ses états

Le foie est un organe qui remplit de nombreuses fonctions essentielles, telles que la synthèse et la distribution de nutriments, le métabolisme des acides aminés, des lipides et des glucides, ainsi que la détoxification des xénotoxiques. Ces fonctions sont principalement remplies par les hépatocytes, qui représentent 70 % des cellules du foie, dont l'une des caractéristiques est d'être polyploïdes [3]. L'existence de cet état polyploïde a été révélé il y a près d'un siècle (en 1925) par W. Jacoby³. Le degré de polyploïdisation dans le foie varie selon l'espèce : chez les rongeurs, plus de 90 % des hépatocytes sont polyploïdes ; chez l'homme, le pourcentage d'hépatocytes polyploïdes atteint 30 à 40 % dans le foie adulte, les hépatocytes étant majoritairement tétraploïdes.

Polyploïdie et développement post-natal du foie

Le développement hépatique est un processus prolongé qui perdure au cours de la vie post-natale. Différents travaux ont défini, dans des modèles rongeurs (rat, souris), les mécanismes associés à la génération des hépatocytes polyploïdes : jusqu'au 21^e jour (J.21) après la naissance, la majorité des hépatocytes sont diploïdes (2n) et se divisent classiquement en donnant naissance à deux cellules filles diploïdes. Notre équipe a montré qu'un processus de cytotidérèse incomplète intervient après J.21. Il permet la formation du premier contingent de cellules polyploïdes : l'hépatocyte tétraploïde binucléé ($2 \times 2n$) [31]. Cet hépatocyte va jouer un rôle pivot dans la mise en place de la polyploïdisation physiologique. Lors de la transition de l'allaitement au sevrage, un hépatocyte diploïde (2n) peut s'engager dans deux cycles de division différents (Figure 3) : soit un cycle de division normal avec genèse de deux hépatocytes fils diploïdes (2n), soit un cycle cellulaire associé à une cytotidérèse

incomplète avec génération d'un hépatocyte tétraploïde binucléé ($2 \times 2n$). Cet hépatocyte est capable de progresser de nouveau dans un cycle de division. Il pourra s'engager soit vers un cycle de division complet, qui aboutira à la formation de deux hépatocytes fils tétraploïdes mononucléés (4n), soit vers un cycle de division incomplet, qui générera un hépatocyte octoploïde binucléé ($2 \times 4n$). Notons que dans le foie, lors de la division des contingents de cellules polyploïdes, le regroupement des centrosomes permet de maintenir l'intégrité génomique [31]. Nos travaux ont montré que le mécanisme de cytotidérèse incomplète prend place au cours de la transition entre allaitement et sevrage, en raison d'une augmentation du taux d'insuline [32-34] (→).

(→) Voir la Dernière Heure de S. Celton-Morizur et C. Desdouets, m/s n° 6-7, juin-juillet 2009, page 651

La signalisation insulinaire contrôle en effet ce processus, en régulant la voie PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT (protein kinase B) [32, 33]. L'activation de la voie PI3K/AKT empêche la formation de l'anneau contractile, notamment par une absence de réorganisation du cytosquelette au plan de division [35]. Les facteurs de transcription E2F1 et E2F8 contrôlent aussi la genèse des hépatocytes binucléés [9, 36]. En effet, chez la souris, la délétion du gène *E2f8* induit dans le parenchyme hépatique une diminution drastique du contingent de cellules binucléées, le tissu adulte restant alors majoritairement diploïde. Ces deux facteurs de transcription réguleraient de façon antagoniste des programmes régulant des gènes de la cytotidérèse [9, 36]. Plus récemment, une étude a révélé l'importance d'un microARN, miR-122, dans le processus de polyploïdisation post-natal. Dans le tissu hépatique, miR-122 inhiberait l'expression de gènes codant des protéines activatrices de la cytotidérèse [37].

Ainsi, la polyploïdie physiologique prend place dans le tissu hépatique par des cycles de division sans cytotidérèse. Dans le tissu sain, les hépatocytes polyploïdes seront majoritairement binucléés (ploïdie cellulaire).

Quelles fonctions pour la polyploïdie physiologique au niveau du foie ?

La polyploïdie n'est-elle qu'une manifestation de la croissance du tissu hépatique ? A-t-elle une fonction particulière ? La signification biologique de la polyploïdisation du foie reste encore assez énigmatique, bien que différentes hypothèses aient été proposées.

³ Jacoby W. Wilhelm Roux'Arch. Entwicklungsmech Org 1925 ; 106 : 124.

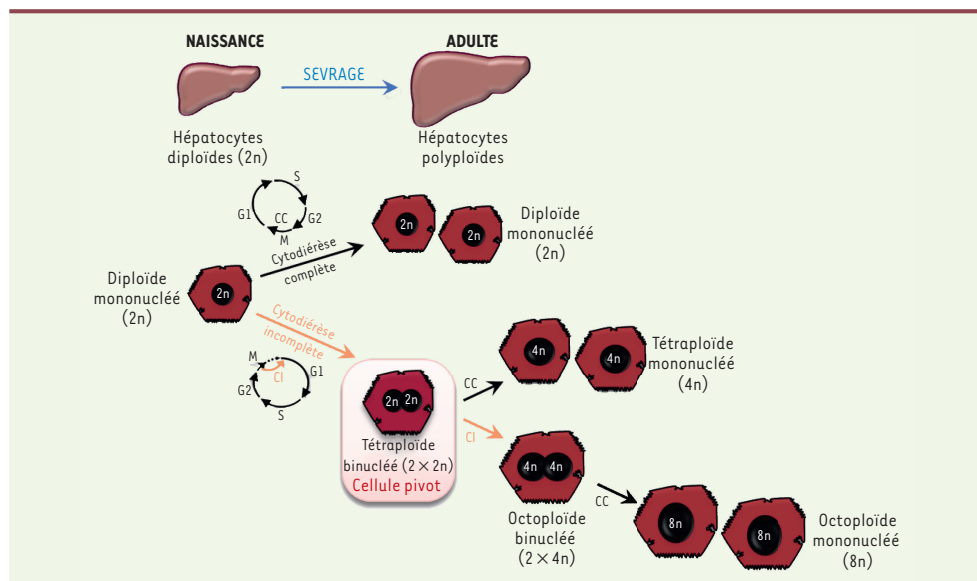


Figure 3. Polyploïdie physiologique. À la naissance, les hépatocytes sont exclusivement mononucléés diploïdes ($2n$). À la transition allaitement-sevrage, les hépatocytes diploïdes peuvent s'engager dans un cycle de division normal (cytotéière complète, CC) engendrant une descendance mononucléée diploïde. Ils peuvent également réaliser un cycle cellulaire avec une cytotéière incomplète (CI) entraînant la formation d'un hépatocyte binucléé tétraploïde ($2 \times 2n$). C'est par ce mécanisme que la polyploïdisation se met en place progressivement dans le parenchyme hépatique, avec la genèse d'hépatocytes tétraploïdes ou octoploïdes, avec un ou deux noyaux.

Première hypothèse : l'économie d'énergie

Cette théorie repose sur l'idée qu'un cycle de division court représente un gain d'énergie pour la cellule. En effet, les événements de cytotéière incomplète permettraient, en échappant à la mitose, une économie en ressources énergétiques. Ce phénomène est particulièrement bénéfique lors d'une croissance tissulaire importante et rapide. Dans le cas du tissu hépatique, la transition entre allaitement et sevrage est une période de forte consommation énergétique, associée à d'importantes modifications du métabolisme lipidique, glucidique, hormonal et du taux de prolifération cellulaire [38]. Pandit *et al.* ont ainsi suggéré que la polyploïdisation hépatique permettrait de maintenir l'homéostasie énergétique [9]. Les travaux d'Anatskaya *et al.* étayaient cette idée. Ils démontrent par des approches hauts débits que la signature polyploïde est associée à une production d'énergie anaérobie et à une production d'ATP provenant plutôt des glucides que des acides gras [39]. Ces résultats suggèrent qu'un état polyploïde permettrait au foie de passer en « mode économie d'énergie ».

Deuxième hypothèse : le gain de fonction

L'état polyploïde permettrait d'augmenter ou de spécifier les capacités fonctionnelles du foie. L'amplification de deux à quatre fois de l'expression des gènes pourrait créer, en fait, un « super

hépatocyte ». Initialement, les travaux de Lu *et al.* semblaient pourtant réfuter cette hypothèse. En effet, l'analyse différentielle de profils d'expression d'hépatocytes diploïdes et polyploïdes ($4n$ et $8n$) ne met en évidence que 50 gènes candidats différemment exprimés selon le degré de ploïdie [40]. D'autres travaux ont également conforté cette idée. Ainsi, l'abolition de la polyploïdie dans un modèle transgénique murin (délétion d'*E2f8*) ne modifie pas les fonctions métaboliques et régénératives du tissu, suggérant le peu de rôle de l'état polyploïde en conditions physiologiques. D'autres données de la littérature sont néanmoins contradictoires. Ainsi, l'analyse des génomes de tissus hépatiques présentant différents niveaux de polyploïdie, a révélé un lien entre polyploïdie et expression génique associée à la survie cellulaire, au métabolisme, à la synthèse des protéines du sang et à l'immunité [39, 41, 42]. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer si la production globale de transcription ou de traduction par cellule varie entre les hépatocytes diploïdes et polyploïdes et pourrait ainsi moduler certaines fonctions du tissu hépatique.

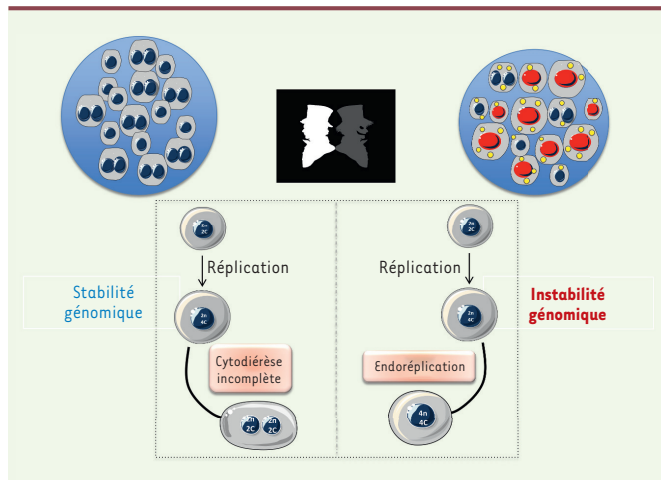


Figure 4. Polyploïdie hépatique : Dr Jekyll ou Mr Hyde. Le foie est l'un des seuls organes qui est capable de modifier son état de ploïdie. Dans un contexte physiologique, les hépatocytes polyploïdes sont majoritairement binucléés, formés par un mécanisme de cytotérièse incomplète (ploïdie cellulaire). Dans des conditions pathologiques, notamment au cours du développement de désordres métaboliques hépatiques, on observe dans le tissu hépatique une modification de la ploïdie nucléaire avec la genèse d'hépatocytes mononucléés polyploïdes ($4n$ ou supérieur à $8n$). Ces cellules sont générées par un cycle d'endoréplication induit par un signal de lésion de l'ADN (exemple pour les hépatocytes mononucléés $4n$). « n » fait référence au nombre de chromosomes, « c » au nombre de chromatides.

Troisième hypothèse : la protection d'un état de transformation

Le foie est considéré comme la « poubelle » de l'organisme. Il est en effet responsable de la métabolisation et de l'élimination de nombreux composés toxiques. L'acquisition de plusieurs lots de chromosomes pourrait atténuer l'effet délétère de mutations inactivatrices qui seraient induites par des agents causant des dommages à l'ADN. Étant cette hypothèse, des études réalisées dans les années 1980 ont montré que l'injection de carcinogènes chimiques (diéthylnitrosamine et 2-acétylamino-fluorène) dans le tissu hépatique induisait effectivement une amplification spécifique de la population hépatocytaire diploïde au cours des différents stades du processus de tumorigenèse [43]. Ces résultats suggéraient qu'un état polyploïde, dans ce contexte particulier, protégeait les cellules de la transformation. Des études récentes révèlent l'existence d'un lien entre régulation de la cytotérièse, ploïdie cellulaire (genèse de cellules binucléées) et prolifération de cellules cancéreuses [44-46]. Les protéines régulatrices de la cytotérièse, telles que l'anilline et la protéine activant la GTPase Rac 1 (RACGAP1) sont en effet surexprimées dans les carcinomes hépatocellulaires (CHC) [45, 46]. Les hépatocytes malins sont ainsi moins susceptibles de générer des hépatocytes binucléés polyploïdes. De même, dans plusieurs modèles de souris présentant des CHC, l'inhibition de l'expression de l'anilline réduit le développement des tumeurs [46]. L'inhibition de la cytotérièse, et donc l'induction d'une ploïdie cellulaire (genèse de cellules binucléées), pourraient ainsi protéger de la progression tumorale.

Polyploïdie et pathologie hépatique

Tout au long de la vie, le foie est constamment exposé à diverses agressions. Les hépatocytes conservent la propriété unique d'auto-renouvellement : ils sont capables de rétablir le foie *ad integrum*. De nombreux travaux ont montré, dans le foie adulte, l'existence d'une

relation entre des modulations de la polyploïdie et une variété de stress cellulaires (surcharge métabolique, dommages de l'ADN et lésions hépatiques induites par des produits chimiques) [3]. Cependant, les mécanismes associés aux altérations de la polyploïdie n'ont pas été identifiés [3]. Dans de récents travaux, nous avons observé que des hépatocytes saturés en triglycérides enchaînent préférentiellement des cycles d'endoréplication modifiant ainsi la polyploïdie physiologique du tissu hépatique.

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD, pour *non alcoholic fatty liver disease*) est l'hépatopathie chronique la plus fréquente dans les pays industrialisés. Elle est associée, notamment, à l'obésité et au diabète de type 2. Cette pathologie se caractérise par une accumulation atypique de triglycérides dans l'hépatocyte. Bien que souvent asymptomatique, cette accumulation peut entraîner une réponse inflammatoire, faisant évoluer la NAFLD en stéatohépatite non alcoolique (ou NASH), qui favorise l'apparition d'une cirrhose et, dans certains cas, le développement d'un carcinome hépatocellulaire. En utilisant des techniques combinant des approches *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins de NAFLD, nous avons observé dans le tissu stéatosique une diminution drastique des hépatocytes binucléés (ploïdie cellulaire physiologique) et, à l'inverse, l'émergence d'hépatocytes mononucléés polyploïdes (ploïdie nucléaire, hépatocytes mononucléés $4n$ ou plus de $8n$) (Figure 4). L'amplification de ces contingents de cellules mononucléées polyploïdes a été confirmée dans le parenchyme hépatique de patients ayant développé



une stéatose. Ces hépatocytes sont générés par endoréplication en réponse à l'activation du point de contrôle DDR (constituée de la voie de signalisation ATR[*ATM and Rad3 related*]/p53/p21) [47, 48]. Le stress oxydatif (production d'espèces réactives de l'oxygène-ROS) est responsable de la mise en place des cycles d'endoréplication, provoquant ainsi une polyploïdisation pathologique au sein du tissu hépatique stéatosique [47, 48].

Le développement d'une stéatose hépatique est donc associé à une amplification de cellules mononucléées polyploïdes (ploïdie nucléaire) (Figure 4). Ces contingents de cellules, générés à la suite d'une induction de signalisation dépendante des ROS, présenteraient un fort potentiel d'instabilité génomique et pourraient participer à la carcinogénèse hépatique.

Conclusion

Le foie est un organe fascinant qui peut modifier son état de ploïdie dans des contextes physiologiques et pathologiques (Figure 4). Un défi futur sera d'examiner et de comprendre notamment : physiologiquement, comment les cellules polyploïdes tolèrent une amplification de chromosomes et de centrosomes et si ce contingent de cellules polyploïdes réoriente les fonctions du tissu (métabolique, régénératif, etc.) ; dans des conditions pathologiques, si l'amplification de la ploïdie nucléaire est associée à d'autres maladies hépatiques, et comment ces cellules se comportent dans les foies endommagés et peuvent participer au processus de tumorigénèse hépatique. ♦

SUMMARY

Hepatic polyploidy: Dr Jekyll or Mr Hyde

Polyploidy (alias whole genome amplification) refers to organisms containing more than two basic sets of chromosomes. Polyploidy was first observed in plants more than a century ago, and it is known that such processes occur in many eukaryotes under a variety of circumstances. In mammals, the development of polyploid cells can contribute to tissue differentiation and therefore possibly a gain of function. Alternately, it can be associated with development of disease such as cancer. Polyploidy can occur because of cell fusion or abnormal cell division. Polyploidy is a common characteristic of the mammalian liver. Polyploidization occurs notably during liver development, but also in adults because of cellular stress. Recent progresses have unraveled the mechanisms and functional consequences of hepatocytes polyploidization during normal and pathological liver growth. ♦

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'ensemble des financeurs essentiels à la réalisation de nos projets : l'Inserm, la Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM : EQU201903007824), l'Institut national du cancer (PRTK-2017, PLBIO 2018-140), le Cancéropôle Ile-de-France (Émergence 2015), l'Association française pour l'étude du foie (AFFE-SUBV 2017), EVA-Plan Cancer Inserm HTE et l'Agence nationale de recherche (ANR-16-CE14).

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Otto SP. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 2007 ; 131 : 452-62.
- Van de Peer Y, Mizrahi E, Marchal K. The evolutionary significance of polyploidy. *Nat Rev Genet* 2017 ; 18 : 411-24.
- Genric G, Desdouets C. Polyploidization in liver tissue. *Am J Pathol* 2014 ; 184 : 322-31.
- Gallagher JP, Grover CE, Hu G, et al. Insights into the ecology and evolution of polyploid plants through network analysis. *Mol Ecol* 2016 ; 25 : 2644-60.
- Ramsey J, Schemske DW. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu Rev Ecol Syst* 1998 ; 29 : 467-501.
- Otto SP, Whitton J. Polyploid incidence and evolution. *Annu Rev Genet* 2000 ; 34 : 401-37.
- Gallardo MH, Bickham JM, Honeycutt RL, et al. Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* 1999 ; 401 : 341.
- Davoli T, de Lange T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011 ; 27 : 585-610.
- Pandit SK, Westendorp B, de Bruin A. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends Cell Biol* 2013 ; 23 : 556-66.
- Ganem NJ, Storchova Z, Pellman D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007 ; 17 : 157-62.
- Storchova Z, Pellman D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004 ; 5 : 45-54.
- Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, et al. Tracking the evolution of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2017 ; 376 : 2109-21.
- Zack TI, Schumacher SE, Carter SL, et al. Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nat Genet* 2013 ; 45 : 1134-40.
- Larsson LI, Bjerregaard B, Talts JF. Cell fusions in mammals. *Histochem Cell Biol* 2008 ; 129 : 551-61.
- Duelli D, Lazebnik Y. Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007 ; 7 : 968-76.
- Gao P, Zheng J. Oncogenic virus-mediated cell fusion: new insights into initiation and progression of oncogenic viruses--related cancers. *Cancer Lett* 2011 ; 303 : 1-8.
- Ovrebø JI and Edgar BA. Polyploidy in tissue homeostasis and regeneration. *Development* 2018 ; 145.
- Edgar BA, Zielke N, Gutierrez C. Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014 ; 15 : 197-210.
- Fox DT, Duronio RJ. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development* 2013 ; 140 : 3-12.
- Davoli T, de Lange T. Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. *Cancer Cell* 2012 ; 21 : 765-76.
- Li F, Wang X, Copasso JM, et al. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol* 1996 ; 28 : 1737-46.
- Zimmet J, Ravid K. Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp Hematol* 2000 ; 28 : 3-16.
- Liu Z, Yue S, Chen X, et al. Regulation of cardiomyocyte polyploidy and multinucleation by CyclinG1. *Circ Res* 2010 ; 106 : 1498-506.
- Ahuja P, Sdek P, MacLellan WR. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev* 2007 ; 87 : 521-44.
- Engel FB, Schebesta M, Keating MT. Anillin localization defect in cardiomyocyte binucleation. *J Mol Cell Cardiol* 2006 ; 41 : 601-12.
- Lacroix B, Maddox AS. Cytokinesis, ploidy and aneuploidy. *J Pathol* 2012 ; 226 : 338-51.
- Schoenfelder KP, Fox DT. The expanding implications of polyploidy. *J Cell Biol* 2015 ; 209 : 485-91.
- Cao J, Wang J, Jackman CP, et al. Tension creates an endoreplication wavefront that leads regeneration of epicardial tissue. *Dev Cell* 2017 ; 42 : 600-15 e4.
- Lazzeri E, Angelotti ML, Peired A, et al. Endocycle-related tubular cell hypertrophy and progenitor proliferation recover renal function after acute kidney injury. *Nat Commun* 2018 ; 9 : 1344.
- Rios AC, Fu NY, Jamieson PR, et al. Essential role for a novel population of binucleated mammary epithelial cells in lactation. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 11400.
- Guidotti JE, Bregerie O, Robert A, et al. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binucleated hepatocytes. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 19095-101.

Références

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

Ablasser, A., Schmid-Burgk, J.L., Hemmerling, I., Horvath, G.L., Schmidt, T., Latz, E., and Hornung, V. (2013). Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. *Nature* *503*, 530–534.

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

Aguilar, P.S., Baylies, M.K., Fleissner, A., Helming, L., Inoue, N., Podbilewicz, B., Wang, H., and Wong, M. (2013). Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms. *Trends Genet.* *29*, 427–437.

Aguilera, A., and García-Muse, T. (2013). Causes of genome instability. *Annu. Rev. Genet.* *47*, 1–32.

Ahn, J., Xia, T., Konno, H., Konno, K., Ruiz, P., and Barber, G.N. (2014). Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. *Nature Communications* *5*, 5166.

Alonso, C., Fernández-Ramos, D., Varela-Rey, M., Martínez-Arranz, I., Navasa, N., Van Liempd, S.M., Lavín Trueba, J.L., Mayo, R., Ilisso, C.P., de Juan, V.G., et al. (2017). Metabolomic Identification of Subtypes of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* *152*, 1449-1461.e7.

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

Anatskaya, O.V., and Vinogradov, A.E. (2010). Somatic polyploidy promotes cell function under stress and energy depletion: evidence from tissue-specific mammal transcriptome. *Funct. Integr. Genomics* *10*, 433–446.

Anstee, Q.M., Targher, G., and Day, C.P. (2013). Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *10*, 330–344.

Anstee, Q.M., Reeves, H.L., Kotsiliti, E., Govaere, O., and Heikenwalder, M. (2019). From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *16*, 411–428.

Anty, R., Morvan, M., Le Corvec, M., Canivet, C.M., Patouraux, S., Gugenheim, J., Bonnafous, S., Bailly-Maitre, B., Sire, O., Tariel, H., et al. (2019). The mid-infrared spectroscopy: A novel non-invasive diagnostic tool for NASH diagnosis in severe obesity. *JHEP Rep* *1*, 361–368.

Aravinthan, A. (2015). Cellular senescence: a hitchhiker’s guide. *Hum. Cell* *28*, 51–64.

Aravinthan, A., Scarpini, C., Tachtatzis, P., Verma, S., Penrhyn-Lowe, S., Harvey, R., Davies, S.E., Allison, M., Coleman, N., and Alexander, G. (2013). Hepatocyte senescence predicts progression in non-alcohol-related fatty liver disease. *J. Hepatol.* *58*, 549–556.

Arya, R., and Bassing, C.H. (2017). V(D)J Recombination Exploits DNA Damage Responses to Promote Immunity. *Trends Genet.* *33*, 479–489.

Asgharpour, A., Cazanave, S.C., Pacana, T., Seneshaw, M., Vincent, R., Banini, B.A., Kumar, D.P., Daita, K., Min, H.-K., Mirshahi, F., et al. (2016). A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J. Hepatol.* *65*, 579–588.

Ashraf, M.N., Asghar, M.W., Rong, Y., Doschak, M.R., and Kiang, T.K.L. (2019). Advanced In Vitro HepaRG Culture Systems for Xenobiotic Metabolism and Toxicity Characterization. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* *44*, 437–458.

- B -

Baeck, C., Wehr, A., Karlmark, K.R., Heymann, F., Vucur, M., Gassler, N., Huss, S., Klussmann, S., Eulberg, D., Luedde, T., et al. (2012). Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* *61*, 416–426.

Baffy, G., Brunt, E.M., and Caldwell, S.H. (2012). Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol* *56*, 1384–1391.

Bai, J., Cervantes, C., Liu, J., He, S., Zhou, H., Zhang, B., Cai, H., Yin, D., Hu, D., Li, Z., et al. (2017). DsbA-L prevents obesity-induced inflammation and insulin resistance by suppressing the mtDNA release-activated cGAS-cGAMP-STING pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *114*, 12196–12201.

Bailly-Maitre, B., Belgardt, B.F., Jordan, S.D., Coornaert, B., von Freyend, M.J., Kleinridders, A., Mauer, J., Cuddy, M., Kress, C.L., Willmes, D., et al. (2010). Hepatic Bax inhibitor-1 inhibits IRE1alpha and protects from obesity-associated insulin resistance and glucose intolerance. *J. Biol. Chem.* *285*, 6198–6207.

Bakhoun, S.F., Ngo, B., Laughney, A.M., Cavallo, J.-A., Murphy, C.J., Ly, P., Shah, P., Sriram, R.K., Watkins, T.B.K., Taunk, N.K., et al. (2018). Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* *553*, 467–472.

Balmer, M.L., and Dufour, J.-F. (2011). [Non-alcoholic steatohepatitis - from NAFLD to MAFLD]. *Ther Umsch* *68*, 183–188.

Bankoglu, E.E., Seyfried, F., Rotzinger, L., Nordbeck, A., Corteville, C., Jurowich, C., Germer, C.T., Otto, C., and Stopper, H. (2016). Impact of weight loss induced by gastric bypass or caloric restriction on oxidative stress and genomic damage in obese Zucker rats. *Free Radic. Biol. Med.* *94*, 208–217.

Barber, G.N. (2015). STING: infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol* *15*, 760–770.

- Bayard, Q., Meunier, L., Peneau, C., Renault, V., Shinde, J., Nault, J.-C., Mami, I., Couchy, G., Amaddeo, G., Tubacher, E., et al. (2018). Cyclin A2/E1 activation defines a hepatocellular carcinoma subclass with a rearrangement signature of replication stress. *Nature Communications* *9*, 5235.
- Baze, A., Parmentier, C., Hendriks, D.F.G., Hurrell, T., Heyd, B., Bachellier, P., Schuster, C., Ingelman-Sundberg, M., and Richert, L. (2018). Three-Dimensional Spheroid Primary Human Hepatocytes in Monoculture and Coculture with Nonparenchymal Cells. *Tissue Eng Part C Methods* *24*, 534–545.
- Bedossa, P., Poitou, C., Veyrie, N., Bouillot, J.-L., Basdevant, A., Paradis, V., Tordjman, J., and Clement, K. (2012). Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* *56*, 1751–1759.
- Begrice, K., Massart, J., Robin, M.-A., Bonnet, F., and Fromenty, B. (2013). Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *58*, 1497–1507.
- Bell, C.C., Hendriks, D.F.G., Moro, S.M.L., Ellis, E., Walsh, J., Renblom, A., Fredriksson Puigvert, L., Dankers, A.C.A., Jacobs, F., Snoeys, J., et al. (2016). Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Scientific Reports* *6*, 25187.
- Benhamouche, S., Decaens, T., Perret, C., and Colnot, S. (2006). [Wnt/beta-catenin pathway and liver metabolic zonation: a new player for an old concept]. *Med Sci (Paris)* *22*, 904–906.
- Ben-Moshe, S., and Itzkovitz, S. (2019). Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *16*, 395–410.
- Bentley, N.J., Holtzman, D.A., Flaggs, G., Keegan, K.S., DeMaggio, A., Ford, J.C., Hoekstra, M., and Carr, A.M. (1996). The *Schizosaccharomyces pombe* rad3 checkpoint gene. *EMBO J.* *15*, 6641–6651.
- Bergheim, I., Weber, S., Vos, M., Krämer, S., Volynets, V., Kaserouni, S., McClain, C.J., and Bischoff, S.C. (2008). Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: Role of endotoxin. *Journal of Hepatology* *48*, 983–992.
- Bergmann, O., Zdunek, S., Felker, A., Salehpour, M., Alkass, K., Bernard, S., Sjöström, S.L., Szewczykowska, M., Jackowska, T., dos Remedios, C., et al. (2015). Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* *161*, 1566–1575.
- Berriot-Varoqueaux, N., Aggerbeck, L.P., Samson-Bouma, M., and Wetterau, J.R. (2000). The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu. Rev. Nutr.* *20*, 663–697.
- Bester, A.C., Roniger, M., Oren, Y.S., Im, M.M., Sarni, D., Chaoat, M., Bensimon, A., Zamir, G., Shewach, D.S., and Kerem, B. (2011). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* *145*, 435–446.

Bethesda, M. (2012). Hydroxyurea. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*, (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases), p.

Bicknell, L.S., Bongers, E.M.H.F., Leitch, A., Brown, S., Schoots, J., Harley, M.E., Aftimos, S., Al-Aama, J.Y., Bober, M., Brown, P.A.J., et al. (2011). Mutations in the pre-replication complex cause Meier-Gorlin syndrome. *Nat. Genet.* *43*, 356–359.

Bikman, B.T., Guan, Y., Shui, G., Siddique, M.M., Holland, W.L., Kim, J.Y., Fabriàs, G., Wenk, M.R., and Summers, S.A. (2012). Fenretinide prevents lipid-induced insulin resistance by blocking ceramide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *287*, 17426–17437.

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

Blackford, A.N., and Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* *66*, 801–817.

Bluteau, D., Lordier, L., Di Stefano, A., Chang, Y., Raslova, H., Debili, N., and Vainchenker, W. (2009). Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* *7*, 227–234.

Boege, Y., Malehmir, M., Healy, M.E., Bettermann, K., Lorentzen, A., Vucur, M., Ahuja, A.K., Böhm, F., Mertens, J.C., Shimizu, Y., et al. (2017). A Dual Role of Caspase-8 in Triggering and Sensing Proliferation-Associated DNA Damage, a Key Determinant of Liver Cancer Development. *Cancer Cell* *32*, 342-359.e10.

Boerkoel, C.F., Takashima, H., John, J., Yan, J., Stankiewicz, P., Rosenbarker, L., André, J.-L., Bogdanovic, R., Burguet, A., Cockfield, S., et al. (2002). Mutant chromatin remodeling protein SMARCAL1 causes Schimke immuno-osseous dysplasia. *Nat. Genet.* *30*, 215–220.

Boess, F., Kamber, M., Romer, S., Gasser, R., Muller, D., Albertini, S., and Suter, L. (2003). Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. *Toxicol. Sci.* *73*, 386–402.

Bou-Nader, M., Caruso, S., Donne, R., Celton-Morizur, S., Calderaro, J., Gentric, G., Cadoux, M., L'Hermitte, A., Klein, C., Guilbert, T., et al. (2019). Polyploidy spectrum: a new marker in HCC classification. *Gut*.

Boursier, J., Fraysse, J., Lafuma, A., Torreton, E., and Ozbay, A.B. (2019). PS-059-Increased healthcare resource utilization and costs in nonalcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis patients with liver disease progression: A multivariate analysis of french national hospital care. *Journal of Hepatology* *70*, e36.

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

Brown, M.V., Compton, S.A., Milburn, M.V., Lawton, K.A., and Cheatham, B. (2013). Metabolomic signatures in lipid-loaded HepaRGs reveal pathways involved in steatotic

progression. *Obesity* (Silver Spring) *21*, E561-570.

Brunt, E.M., and Kleiner, D.E. (2017). Challenges in the hepatic histopathology in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* *66*, 1539–1540.

Brunt, E.M., Janney, C.G., Di Bisceglie, A.M., Neuschwander-Tetri, B.A., and Bacon, B.R. (1999). Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* *94*, 2467–2474.

Buisson, R., Boisvert, J.L., Benes, C.H., and Zou, L. (2015). Distinct but Concerted Roles of ATR, DNA-PK, and Chk1 in Countering Replication Stress during S Phase. *Mol. Cell* *59*, 1011–1024.

Burdette, D.L., Monroe, K.M., Sotelo-Troha, K., Iwig, J.S., Eckert, B., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Vance, R.E. (2011). STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* *478*, 515–518.

Buzzetti, E., Pinzani, M., and Tsochatzis, E.A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metab. Clin. Exp.*

- C -

Cai, D., Yuan, M., Frantz, D.F., Melendez, P.A., Hansen, L., Lee, J., and Shoelson, S.E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat. Med.* *11*, 183–190.

Cai, X., Chiu, Y.-H., and Chen, Z.J. (2014). The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Mol. Cell* *54*, 289–296.

Caldez, M.J., Bjorklund, M., and Kaldis, P. (2020). Cell cycle regulation in NAFLD: when imbalanced metabolism limits cell division. *Hepatol Int* *14*, 463–474.

Cao, L., Peng, B., Yao, L., Zhang, X., Sun, K., Yang, X., and Yu, L. (2010). The ancient function of RB-E2F pathway: insights from its evolutionary history. *Biol. Direct* *5*, 55.

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

Chabosseau, P., Buhagiar-Labarchède, G., Onclercq-Delic, R., Lambert, S., Debatisse, M., Brison, O., and Amor-Guéret, M. (2011). Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nat Commun* *2*, 368.

Charlton, M., Sreekumar, R., Rasmussen, D., Lindor, K., and Nair, K.S. (2002). Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *35*, 898–904.

Charlton, M., Viker, K., Krishnan, A., Sanderson, S., Veldt, B., Kaalsbeek, A.J., Kendrick, M., Thompson, G., Que, F., Swain, J., et al. (2009). Differential expression of lumican and fatty acid binding protein-1: new insights into the histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 49, 1375–1384.

Charlton, M.R., Burns, J.M., Pedersen, R.A., Watt, K.D., Heimbach, J.K., and Dierkhising, R.A. (2011). Frequency and Outcomes of Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* 141, 1249–1253.

Chen, E.H., Grote, E., Mohler, W., and Vignery, A. (2007). Cell–cell fusion. *FEBS Letters* 581, 2181–2193.

Chen, H.-Z., Ouseph, M.M., Li, J., Pécot, T., Chokshi, V., Kent, L., Bae, S., Byrne, M., Duran, C., Comstock, G., et al. (2012). Canonical and atypical E2Fs regulate the mammalian endocycle. *Nat. Cell Biol.* 14, 1192–1202.

Chen, Q., Boire, A., Jin, X., Valiente, M., Er, E.E., Lopez-Soto, A., Jacob, L., Patwa, R., Shah, H., Xu, K., et al. (2016a). Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature* 533, 493–498.

Chen, X., Zhang, F., Gong, Q., Cui, A., Zhuo, S., Hu, Z., Han, Y., Gao, J., Sun, Y., Liu, Z., et al. (2016b). Hepatic ATF6 Increases Fatty Acid Oxidation to Attenuate Hepatic Steatosis in Mice Through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α . *Diabetes* 65, 1904–1915.

Cho, C.-S., Park, H.-W., Ho, A., Semple, I.A., Kim, B., Jang, I., Park, H., Reilly, S., Saltiel, A.R., and Lee, J.H. (2018). Lipotoxicity induces hepatic protein inclusions through TANK binding kinase 1–mediated p62/sequestosome 1 phosphorylation. *Hepatology* 68, 1331–1346.

Choi, S.H., and Ginsberg, H.N. (2011). Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 353–363.

Civril, F., Deimling, T., de Oliveira Mann, C.C., Ablasser, A., Moldt, M., Witte, G., Hornung, V., and Hopfner, K.-P. (2013). Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature* 498, 332–337.

Clubb, F.J., and Bishop, S.P. (1984). Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. *Lab. Invest.* 50, 571–577.

Clynes, D., Jelinska, C., Xella, B., Ayyub, H., Taylor, S., Mitson, M., Bachrati, C.Z., Higgs, D.R., and Gibbons, R.J. (2014). ATRX dysfunction induces replication defects in primary mouse cells. *PLoS ONE* 9, e92915.

Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332, 1519–1523.

Cole, B.K., Feaver, R.E., Wamhoff, B.R., and Dash, A. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) models in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 13, 193–205.

Collin de l'Hortet, A., Zerrad-Saadi, A., Prip-Buus, C., Fauveau, V., Helmy, N., Ziol, M., Vons, C., Billot, K., Baud, V., Gilgenkrantz, H., et al. (2014). GH administration rescues fatty liver regeneration impairment by restoring GH/EGFR pathway deficiency. *Endocrinology* *155*, 2545–2554.

Coquel, F., Silva, M.-J., Técher, H., Zadorozhny, K., Sharma, S., Nieminuszczy, J., Mettling, C., Dardillac, E., Barthe, A., Schmitz, A.-L., et al. (2018). SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction. *Nature* *557*, 57–61.

Cornell, R.P. (1985). Gut-derived endotoxin elicits hepatotrophic factor secretion for liver regeneration. *Am. J. Physiol.* *249*, R551-562.

Creasy, M.R., and Alberman, E.D. (1976). Congenital malformations of the central nervous system in spontaneous abortions. *J. Med. Genet.* *13*, 9–16.

Crespo, J., Cayón, A., Fernández-Gil, P., Hernández-Guerra, M., Mayorga, M., Domínguez-Díez, A., Fernández-Escalante, J.C., and Pons-Romero, F. (2001). Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* *34*, 1158–1163.

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

Crow, Y.J., and Manel, N. (2015). Aicardi-Goutières syndrome and the type I interferonopathies. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 429–440.

Crow, Y.J., and Rehwinkel, J. (2009). Aicardi-Goutieres syndrome and related phenotypes: linking nucleic acid metabolism with autoimmunity. *Hum. Mol. Genet.* *18*, R130-136.

Crow, Y.J., Hayward, B.E., Parmar, R., Robins, P., Leitch, A., Ali, M., Black, D.N., van Bokhoven, H., Brunner, H.G., Hamel, B.C., et al. (2006a). Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nat. Genet.* *38*, 917–920.

Crow, Y.J., Leitch, A., Hayward, B.E., Garner, A., Parmar, R., Griffith, E., Ali, M., Semple, C., Aicardi, J., Babul-Hirji, R., et al. (2006b). Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat. Genet.* *38*, 910–916.

Cruz, V.H., Arner, E.N., Wynne, K.W., Scherer, P.E., and Brekken, R.A. (2018). Loss of Tbk1 kinase activity protects mice from diet-induced metabolic dysfunction. *Mol Metab* *16*, 139–149.

Csak, T., Ganz, M., Pespisa, J., Kodys, K., Dolganiuc, A., and Szabo, G. (2011a). Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology* *54*, 133–144.

Csak, T., Velayudham, A., Hritz, I., Petrasek, J., Levin, I., Lippai, D., Catalano, D., Mandrekar, P., Dolganiuc, A., Kurt-Jones, E., et al. (2011b). Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and toll-like receptor 4 expression attenuates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *300*, G433-441.

- D -

D'Angiolella, V., Donato, V., Forrester, F.M., Jeong, Y.-T., Pellacani, C., Kudo, Y., Saraf, A., Florens, L., Washburn, M.P., and Pagano, M. (2012). Cyclin F-mediated degradation of ribonucleotide reductase M2 controls genome integrity and DNA repair. *Cell* *149*, 1023–1034.

Dash, A., Blackman, B.R., and Wamhoff, B.R. (2012). Organotypic systems in drug metabolism and toxicity: challenges and opportunities. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* *8*, 999–1014.

Dash, A., Simmers, M.B., Deering, T.G., Berry, D.J., Feaver, R.E., Hastings, N.E., Pruett, T.L., LeCluyse, E.L., Blackman, B.R., and Wamhoff, B.R. (2013). Hemodynamic flow improves rat hepatocyte morphology, function, and metabolic activity in vitro. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *304*, C1053-1063.

Daugherty, E.K., Balmus, G., Al Saei, A., Moore, E.S., Abi Abdallah, D., Rogers, A.B., Weiss, R.S., and Maurer, K.J. (2012). The DNA damage checkpoint protein ATM promotes hepatocellular apoptosis and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Cycle* *11*, 1918–1928.

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

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

Dhanasekaran, R., Nault, J.-C., Roberts, L.R., and Zucman-Rossi, J. (2019). Genomic Medicine and Implications for Hepatocellular Carcinoma Prevention and Therapy. *Gastroenterology* *156*, 492–509.

Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* *444*, 638–642.

Diamond, J.M., Vanpouille-Box, C., Spada, S., Rudqvist, N.-P., Chapman, J.R., Ueberheide, B.M., Pilonis, K.A., Sarfraz, Y., Formenti, S.C., and Demaria, S. (2018). Exosomes Shuttle TREX1-Sensitive IFN-Stimulatory dsDNA from Irradiated Cancer Cells to DCs. *Cancer Immunol Res* *6*, 910–920.

Diehl, A.M., and Day, C. (2017). Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* *377*, 2063–2072.

Diehl, F.F., Lewis, C.A., Fiske, B.P., and Vander Heiden, M.G. (2019). Cellular redox state constrains serine synthesis and nucleotide production to impact cell proliferation. *Nat Metab* *1*, 861–867.

Dikovskaya, D., Schiffmann, D., Newton, I.P., Oakley, A., Kroboth, K., Sansom, O., Jamieson, T.J., Meniel, V., Clarke, A., and Näthke, I.S. (2007). Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J. Cell Biol.* *176*, 183–195.

Diraison, F., Moulin, P., and Beylot, M. (2003). Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab.* *29*, 478–485.

Diril, M.K., Ratnacaram, C.K., Padmakumar, V.C., Du, T., Wasser, M., Coppola, V., Tessarollo, L., and Kaldis, P. (2012). Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 3826–3831.

Dixon, L.J., Flask, C.A., Papouchado, B.G., Feldstein, A.E., and Nagy, L.E. (2013). Caspase-1 as a central regulator of high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS ONE* *8*, e56100.

Doege, H., and Stahl, A. (2006). Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* *21*, 259–268.

Doege, H., Baillie, R.A., Ortegon, A.M., Tsang, B., Wu, Q., Punreddy, S., Hirsch, D., Watson, N., Gimeno, R.E., and Stahl, A. (2006). Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology* *130*, 1245–1258.

Doege, H., Grimm, D., Falcon, A., Tsang, B., Storm, T.A., Xu, H., Ortegon, A.M., Kazantzis, M., Kay, M.A., and Stahl, A. (2008). Silencing of hepatic fatty acid transporter protein 5 in vivo reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and improves hyperglycemia. *J. Biol. Chem.* *283*, 22186–22192.

Donati, B., Pietrelli, A., Pingitore, P., Dongiovanni, P., Caddeo, A., Walker, L., Baselli, G., Pelusi, S., Rosso, C., Vanni, E., et al. (2017). Telomerase reverse transcriptase germline mutations and hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Cancer Med* *6*, 1930–1940.

Donne, R., Saroul-Aïnama, M., Cordier, P., Celton-Morizur, S., and Desdouets, C. (2020). Polyploidy in liver development, homeostasis and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 1–15.

Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D., and Parks, E.J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* *115*, 1343–1351.

Dou, Z., Ghosh, K., Vizioli, M.G., Zhu, J., Sen, P., Wangenstein, K.J., Simithy, J., Lan, Y., Lin, Y., Zhou, Z., et al. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* 550, 402.

Du, M., and Chen, Z.J. (2018). DNA-induced liquid phase condensation of cGAS activates innate immune signaling. *Science* 361, 704–709.

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

Dunphy, G., Flannery, S.M., Almine, J.F., Connolly, D.J., Paulus, C., Jønsson, K.L., Jakobsen, M.R., Nevels, M.M., Bowie, A.G., and Unterholzner, L. (2018). Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-κB Signaling after Nuclear DNA Damage. *Mol. Cell* 71, 745-760.e5.

Dutkowski, P., Linecker, M., DeOliveira, M.L., Müllhaupt, B., and Clavien, P.-A. (2015). Challenges to liver transplantation and strategies to improve outcomes. *Gastroenterology* 148, 307–323.

- E -

Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., and Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86, 839–848.

Edgar, B.A., and Orr-Weaver, T.L. (2001). Endoreplication Cell Cycles: More for Less. *Cell* 105, 297–306.

Einer, C., Hohenester, S., Wimmer, R., Wottke, L., Artmann, R., Schulz, S., Gosmann, C., Simmons, A., Leitzinger, C., Eberhagen, C., et al. (2018). Mitochondrial adaptation in steatotic mice. *Mitochondrion* 40, 1–12.

Engström, Y., and Rozell, B. (1988). Immunocytochemical evidence for the cytoplasmic localization and differential expression during the cell cycle of the M1 and M2 subunits of mammalian ribonucleotide reductase. *EMBO J.* 7, 1615–1620.

Eslam, M., Sanyal, A.J., George, J., and International Consensus Panel (2020). MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 158, 1999-2014.e1.

Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z., and Sanyal, A.J. (2018). Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 67, 123–133.

Fabbrini, E., Mohammed, B.S., Magkos, F., Korenblat, K.M., Patterson, B.W., and Klein, S. (2008). Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* *134*, 424–431.

Faeh, D., Minehira, K., Schwarz, J.-M., Periasamy, R., Park, S., and Tappy, L. (2005). Effect of Fructose Overfeeding and Fish Oil Administration on Hepatic De Novo Lipogenesis and Insulin Sensitivity in Healthy Men. *Diabetes* *54*, 1907–1913.

Falcon, A., Doege, H., Fluit, A., Tsang, B., Watson, N., Kay, M.A., and Stahl, A. (2010). FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *299*, E384–393.

Farhadi, A., Gundlapalli, S., Shaikh, M., Frantzides, C., Harrell, L., Kwasny, M.M., and Keshavarzian, A. (2008). Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* *28*, 1026–1033.

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

Fava, L.L., Schuler, F., Sladky, V., Haschka, M.D., Soratroi, C., Eiterer, L., Demetz, E., Weiss, G., Geley, S., Nigg, E.A., et al. (2017). The PIDDosome activates p53 in response to supernumerary centrosomes. *Genes Dev.* *31*, 34–45.

Feaver, R.E., Cole, B.K., Lawson, M.J., Hoang, S.A., Marukian, S., Blackman, B.R., Figler, R.A., Sanyal, A.J., Wamhoff, B.R., and Dash, A. (2016). Development of an in vitro human liver system for interrogating nonalcoholic steatohepatitis. *JCI Insight* *1*, e90954.

Febbraio, M.A., Reibe, S., Shalpour, S., Ooi, G.J., Watt, M.J., and Karin, M. (2019). Preclinical Models for Studying NASH-Driven HCC: How Useful Are They? *Cell Metab.* *29*, 18–26.

Fingas, C.D., Best, J., Sowa, J.P., and Canbay, A. (2016). Epidemiology of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis (Hoboken)* *8*, 119–122.

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

Fortier, M., Cadoux, M., Boussetta, N., Pham, S., Donné, R., Couty, J.-P., Desdouets, C., and Celton-Morizur, S. (2019). Hepatospecific ablation of p38 α MAPK governs liver regeneration through modulation of inflammatory response to CCl₄-induced acute injury. *Sci Rep* *9*, 14614.

Fox, D.T., and Duronio, R.J. (2013). Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development* *140*, 3–12.

Fragkos, M., and Naim, V. (2017). Rescue from replication stress during mitosis. *Cell Cycle* *16*, 613–633.

Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., and Sanyal, A.J. (2018a). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* *24*, 908–922.

Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., and Sanyal, A.J. (2018b). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* *24*, 908–922.

Fu, D., Calvo, J.A., and Samson, L.D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer* *12*, 104–120.

Fujii, H., Ikura, Y., Arimoto, J., Sugioka, K., Iezzoni, J.C., Park, S.H., Naruko, T., Itabe, H., Kawada, N., Caldwell, S.H., et al. (2009). Expression of perilipin and adipophilin in nonalcoholic fatty liver disease; relevance to oxidative injury and hepatocyte ballooning. *J. Atheroscler. Thromb.* *16*, 893–901.

Fujii, M., Shibazaki, Y., Wakamatsu, K., Honda, Y., Kawauchi, Y., Suzuki, K., Arumugam, S., Watanabe, K., Ichida, T., Asakura, H., et al. (2013). A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol* *46*, 141–152.

- G -

Gadd, V.L., Skoien, R., Powell, E.E., Fagan, K.J., Winterford, C., Horsfall, L., Irvine, K., and Clouston, A.D. (2014). The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *59*, 1393–1405.

Gaillard, H., García-Muse, T., and Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 276–289.

Gallardo, M.H., Bickham, J.W., Honeycutt, R.L., Ojeda, R.A., and Köhler, N. (1999). Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* *401*, 341.

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

Gao, D., Wu, J., Wu, Y.-T., Du, F., Aroh, C., Yan, N., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013a). Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science* *341*, 903–906.

Gao, P., Ascano, M., Zillinger, T., Wang, W., Dai, P., Serganov, A.A., Gaffney, B.L., Shuman, S., Jones, R.A., Deng, L., et al. (2013b). Structure-function analysis of STING activation by c[G(2',5')pA(3',5')p] and targeting by antiviral DMXAA. *Cell* *154*, 748–762.

Garcia-Martinez, I., Santoro, N., Chen, Y., Hoque, R., Ouyang, X., Caprio, S., Shlomchik, M.J., Coffman, R.L., Candia, A., and Mehal, W.Z. (2016). Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9. *J. Clin. Invest.* *126*, 859–864.

Garcia-Martinez, I., Santoro, N., Chen, Y., Hoque, R., Ouyang, X., Caprio, S., Shlomchik, M.J., Coffman, R.L., Candia, A., and Mehal, W.Z. Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9. *J Clin Invest* 126, 859–864.

Gariani, K., Menzies, K.J., Ryu, D., Wegner, C.J., Wang, X., Ropelle, E.R., Moullan, N., Zhang, H., Perino, A., Lemos, V., et al. (2016). Eliciting the mitochondrial unfolded protein response by nicotinamide adenine dinucleotide repletion reverses fatty liver disease in mice. *Hepatology* 63, 1190–1204.

Gariani, K., Ryu, D., Menzies, K.J., Yi, H.-S., Stein, S., Zhang, H., Perino, A., Lemos, V., Katsyuba, E., Jha, P., et al. (2017). Inhibiting poly ADP-ribosylation increases fatty acid oxidation and protects against fatty liver disease. *J. Hepatol.* 66, 132–141.

GBD 2015 Obesity Collaborators, Afshin, A., Forouzanfar, M.H., Reitsma, M.B., Sur, P., Estep, K., Lee, A., Marczak, L., Mokdad, A.H., Moradi-Lakeh, M., et al. (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N. Engl. J. Med.* 377, 13–27.

Ge, C., Vilfranc, C.L., Che, L., Pandita, R.K., Hambarde, S., Andreassen, P.R., Niu, L., Olowokure, O., Shah, S., Waltz, S.E., et al. (2019). The BRUCE-ATR Signaling Axis Is Required for Accurate DNA Replication and Suppression of Liver Cancer Development. *Hepatology* 69, 2608–2622.

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

Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J.E., Bhattacharya, S., Rideout, W.M., Bronson, R.T., Gardner, H., and Sicinski, P. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 114, 431–443.

Gentili, M., Kowal, J., Tkach, M., Satoh, T., Lahaye, X., Conrad, C., Boyron, M., Lombard, B., Durand, S., Kroemer, G., et al. (2015). Transmission of innate immune signaling by packaging of cGAMP in viral particles. *Science* 349, 1232–1236.

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

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

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

Gentric, G., Celton-Morizur, S., and Desdouets, C. (2015c). Polyploidy and liver proliferation. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 36, 29–34.

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

- Germain, L., Blouin, M.J., and Marceau, N. (1988). Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components. *Cancer Res.* *48*, 4909–4918.
- Geschwind, I.I., Alfert, M., and Schooley, C. (1958). Liver regeneration and hepatic polyploidy in the hypophysectomized rat. *Exp. Cell Res.* *15*, 232–235.
- Ghemrawi, R., Battaglia-Hsu, S.-F., and Arnold, C. (2018). Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disorders. *Cells* *7*, 63.
- Gibbons, G.F. (1990). Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem. J.* *268*, 1–13.
- Gilgenkrantz, H., and Collin de l'Hortet, A. (2018). Understanding Liver Regeneration: From Mechanisms to Regenerative Medicine. *Am. J. Pathol.* *188*, 1316–1327.
- Ginsberg, H.N., and Fisher, E.A. (2009). The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S162-166.
- Goldstone, D.C., Ennis-Adeniran, V., Hedden, J.J., Groom, H.C.T., Rice, G.I., Christodoulou, E., Walker, P.A., Kelly, G., Haire, L.F., Yap, M.W., et al. (2011). HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature* *480*, 379–382.
- Gomes, A.L., Teijeiro, A., Burén, S., Tummala, K.S., Yilmaz, M., Waisman, A., Theurillat, J.-P., Perna, C., and Djouder, N. (2016). Metabolic Inflammation-Associated IL-17A Causes Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* *30*, 161–175.
- Göpfert, T., Eckardt, K.U., Geb, B., and Kurtz, A. (1997). Oxygen-dependent regulation of erythropoietin gene expression in rat hepatocytes. *Kidney Int.* *51*, 502–506.
- Gottlieb, T.M., and Jackson, S.P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: Requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* *72*, 131–142.
- Graaf, I.A. de, Groothuis, G.M., and Olinga, P. (2007). Precision-cut tissue slices as a tool to predict metabolism of novel drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* *3*, 879–898.
- Greco, D., Kotronen, A., Westerbacka, J., Puig, O., Arkkila, P., Kiviluoto, T., Laitinen, S., Kolak, M., Fisher, R.M., Hamsten, A., et al. (2008). Gene expression in human NAFLD. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *294*, G1281-1287.
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Canine, I., Guyomard, C., Lucas, J., Treppe, C., and Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 15655–15660.
- Gruenbaum-Cohen, Y., Harel, I., Umansky, K.-B., Tzahor, E., Snapper, S.B., Shilo, B.-Z., and Schejter, E.D. (2012). The actin regulator N-WASp is required for muscle-cell fusion in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 11211–11216.

Guengerich, F.P. (1999). Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *39*, 1–17.

Guidotti, J.-E., Br gerie, O., Robert, A., Debey, P., Brechot, C., and Desdouets, C. (2003a). Liver Cell Polyploidization: A Pivotal Role for Binuclear Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* *278*, 19095–19101.

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

Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M.F., Person, M.D., and Paull, T.T. (2010). ATM activation by oxidative stress. *Science* *330*, 517–521.

Gyori, B.M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P.S., Hsu, D., and Clement, M.-V. (2014). OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol* *2*, 457–465.

- H -

Hamano, M., Ezaki, H., Kiso, S., Furuta, K., Egawa, M., Kizu, T., Chatani, N., Kamada, Y., Yoshida, Y., and Takehara, T. (2014). Lipid overloading during liver regeneration causes delayed hepatocyte DNA replication by increasing ER stress in mice with simple hepatic steatosis. *J. Gastroenterol.* *49*, 305–316.

Han, H.-S., Kang, G., Kim, J.S., Choi, B.H., and Koo, S.-H. (2016). Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp. Mol. Med.* *48*, e218.

Hartwell, L.H., and Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* *246*, 629–634.

Hattori, N., Davies, T.C., Anson-Cartwright, L., and Cross, J.C. (2000). Periodic expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p57(Kip2) in trophoblast giant cells defines a G2-like gap phase of the endocycle. *Mol. Biol. Cell* *11*, 1037–1045.

Henao-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W.Z., Strowig, T., Thaiss, C.A., Kau, A.L., Eisenbarth, S.C., Jurczak, M.J., et al. (2012). Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* *482*, 179–185.

Herrtwich, L., Nanda, I., Evangelou, K., Nikolova, T., Horn, V., Sagar, null, Erny, D., Stefanowski, J., Rogell, L., Klein, C., et al. (2016). DNA Damage Signaling Instructs Polyploid Macrophage Fate in Granulomas. *Cell* *167*, 1264-1280.e18.

Heymann, F., and Tacke, F. (2016). Immunology in the liver--from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *13*, 88–110.

Hikita, H., Takehara, T., Shimizu, S., Kodama, T., Li, W., Miyagi, T., Hosui, A., Ishida, H., Ohkawa, K., Kanto, T., et al. (2009). Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. *Hepatology* 50, 1217–1226.

Hindi, S.M., Tajrish, M.M., and Kumar, A. (2013). Signaling Mechanisms in Mammalian Myoblast Fusion. *Sci Signal* 6, re2.

Hirsova, P., Ibrahim, S.H., Gores, G.J., and Malhi, H. (2016). Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis. *J. Lipid Res.* 57, 1758–1770.

Hochegger, H., Takeda, S., and Hunt, T. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 910–916.

Holmström, K.M., and Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 411–421.

Hopfner, K.-P., and Hornung, V. (2020). Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*

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

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

Hsu, S.H., Delgado, E.R., Otero, P.A., Teng, K.Y., Kutay, H., Meehan, K.M., Moroney, J.B., Monga, J.K., Hand, N.J., Friedman, J.R., et al. (2016b). MicroRNA-122 Regulates Polyploidization in the Murine Liver. *Hepatology*.

Hu, C.-M., Tien, S.-C., Hsieh, P.-K., Jeng, Y.-M., Chang, M.-C., Chang, Y.-T., Chen, Y.-J., Chen, Y.-J., Lee, E.Y.-H.P., and Lee, W.-H. (2019). High Glucose Triggers Nucleotide Imbalance through O-GlcNAcylation of Key Enzymes and Induces KRAS Mutation in Pancreatic Cells. *Cell Metab.* 29, 1334-1349.e10.

Hu, L., Plafker, K., Vorozhko, V., Zuna, R.E., Hanigan, M.H., Gorbsky, G.J., Plafker, S.M., Angeletti, P.C., and Ceresa, B.P. (2009). Human papillomavirus 16 E5 induces bi-nucleated cell formation by cell-cell fusion. *Virology* 384, 125–134.

Huminiecki, L., and Heldin, C.H. (2010). 2R and remodeling of vertebrate signal transduction engine. *BMC Biol.* 8, 146.

Hummel, K.P., Dickie, M.M., and Coleman, D.L. (1966). Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 153, 1127–1128.

Hussain, M.M., Shi, J., and Dreizen, P. (2003). Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J. Lipid Res.* 44, 22–32.

lizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G., Horton, J.D., and Uyeda, K. (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 7281–7286.

Ioannou, G.N., Haigh, W.G., Thorning, D., and Savard, C. (2013). Hepatic cholesterol crystals and crown-like structures distinguish NASH from simple steatosis. *J. Lipid Res.* *54*, 1326–1334.

Ioannou, G.N., Van Rooyen, D.M., Savard, C., Haigh, W.G., Yeh, M.M., Teoh, N.C., and Farrell, G.C. (2015). Cholesterol-lowering drugs cause dissolution of cholesterol crystals and disperse Kupffer cell crown-like structures during resolution of NASH. *J. Lipid Res.* *56*, 277–285.

Ipsen, D.H., Lykkesfeldt, J., and Tveden-Nyborg, P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell. Mol. Life Sci.* *75*, 3313–3327.

Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* *455*, 674–678.

Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* *461*, 788–792.

Jahn, D., Kircher, S., Hermanns, H.M., and Geier, A. (2019). Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* *1865*, 943–953.

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

Jensen, T., Abdelmalek, M.F., Sullivan, S., Nadeau, K.J., Green, M., Roncal, C., Nakagawa, T., Kuwabara, M., Sato, Y., Kang, D.-H., et al. (2018). Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* *68*, 1063–1075.

Jong, A.Y., Yu, K., Zhou, B., Frgala, T., Reynolds, C.P., and Yen, Y. (1998). A simple and sensitive ribonucleotide reductase assay. *J. Biomed. Sci.* *5*, 62–68.

Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., and Krysko, D.V. (2013). Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* *38*, 209–223.

Kagan, V.E., Tyurin, V.A., Jiang, J., Tyurina, Y.Y., Ritov, V.B., Amoscato, A.A., Osipov, A.N., Belikova, N.A., Kapralov, A.A., Kini, V., et al. (2005). Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat. Chem. Biol.* *1*, 223–232.

- Kamagate, A., and Dong, H.H. (2008). FoxO1 integrates insulin signaling to VLDL production. *Cell Cycle* 7, 3162–3170.
- Kang, M.-S., Yu, S.-L., Lim, H.-S., Choi, B., Park, C.-S., Kang, J.-H., and Lee, S.-K. (2010). Mitotic catastrophe induced by overexpression of budding yeast Rad2p. *Yeast* 27, 399–411.
- Kanuri, G., and Bergheim, I. (2013). In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Int J Mol Sci* 14, 11963–11980.
- Katsyuba, E., Romani, M., Hofer, D., and Auwerx, J. (2020). NAD + homeostasis in health and disease. *Nature Metabolism* 2, 9–31.
- Kaufman, M.H. (1991). Histochemical identification of primordial germ cells and differentiation of the gonads in homozygous tetraploid mouse embryos. *J. Anat.* 179, 169–181.
- Kawano, Y., and Cohen, D.E. (2013). Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.* 48, 434–441.
- Kazankov, K., Jørgensen, S.M.D., Thomsen, K.L., Møller, H.J., Vilstrup, H., George, J., Schuppan, D., and Grønbaek, H. (2019). The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 145–159.
- Kitao, H., Iimori, M., Kataoka, Y., Wakasa, T., Tokunaga, E., Saeki, H., Oki, E., and Maehara, Y. (2018). DNA replication stress and cancer chemotherapy. *Cancer Science* 109, 264–271.
- Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.-C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., et al. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41, 1313–1321.
- Kohjima, M., Enjoji, M., Higuchi, N., Kato, M., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Fujino, T., Yada, M., Yada, R., Harada, N., et al. (2007). Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Med.* 20, 351–358.
- Koliaki, C., Szendroedi, J., Kaul, K., Jelenik, T., Nowotny, P., Jankowiak, F., Herder, C., Carstensen, M., Krausch, M., Knoefel, W.T., et al. (2015). Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab.* 21, 739–746.
- Koonen, D.P.Y., Jacobs, R.L., Febbraio, M., Young, M.E., Soltys, C.-L.M., Ong, H., Vance, D.E., and Dyck, J.R.B. (2007). Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes* 56, 2863–2871.
- Kotsantis, P., Petermann, E., and Boulton, S.J. (2018). Mechanisms of Oncogene-Induced Replication Stress: Jigsaw Falling into Place. *Cancer Discov* 8, 537–555.
- Kozyra, M., Johansson, I., Nordling, Å., Ullah, S., Lauschke, V.M., and Ingelman-Sundberg, M. (2018). Human hepatic 3D spheroids as a model for steatosis and insulin resistance. *Scientific Reports* 8, 14297.

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

Kurinna, S., Stratton, S.A., Coban, Z., Schumacher, J.M., Grompe, M., Duncan, A.W., and Barton, M.C. (2013). p53 regulates a mitotic transcription program and determines ploidy in normal mouse liver. *Hepatology* *57*, 2004–2013.

Kwon, J., and Bakhoun, S.F. (2020). The Cytosolic DNA-Sensing cGAS-STING Pathway in Cancer. *Cancer Discov* *10*, 26–39.

- L -

Lambert, J.E., Ramos-Roman, M.A., Browning, J.D., and Parks, E.J. (2014). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* *146*, 726–735.

Laurin, M., Fradet, N., Blangy, A., Hall, A., Vuori, K., and Côté, J.-F. (2008). The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 15446–15451.

Le Guillou, D., Bucher, S., Begriche, K., Hoët, D., Lombès, A., Labbe, G., and Fromenty, B. (2018). Drug-Induced Alterations of Mitochondrial DNA Homeostasis in Steatotic and Nonsteatotic HepaRG Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *365*, 711–726.

Lebeaupin, C., Vallée, D., Hazari, Y., Hetz, C., Chevet, E., and Bailly-Maitre, B. (2018). Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* *69*, 927–947.

Lebofsky, R., and Bensimon, A. (2005). DNA replication origin plasticity and perturbed fork progression in human inverted repeats. *Mol Cell Biol* *25*, 6789–6797.

Leclercq, I.A., Vansteenbergh, M., Lebrun, V.B., VanHul, N.K., Abarca-Quinones, J., Sempoux, C.L., Picard, C., Starkel, P., and Horsmans, Y.L. (2006). Defective hepatic regeneration after partial hepatectomy in leptin-deficient mice is not rescued by exogenous leptin. *Lab Invest* *86*, 1161–1171.

Lee, A.-H., Scapa, E.F., Cohen, D.E., and Glimcher, L.H. (2008). Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* *320*, 1492–1496.

Lee, J.Y., Moon, J.H., Park, J.S., Lee, B.-W., Kang, E.S., Ahn, C.W., Lee, H.C., and Cha, B.S. (2011). Dietary oleate has beneficial effects on every step of non-alcoholic Fatty liver disease progression in a methionine- and choline-deficient diet-fed animal model. *Diabetes Metab J* *35*, 489–496.

Lens, S.M.A., and Medema, R.H. (2019). Cytokinesis defects and cancer. *Nat Rev Cancer* *19*, 32–45.

- Li, T., and Chen, Z.J. (2018). The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. *J Exp Med* 215, 1287–1299.
- Li, Y.-N., and Su, Y. (2020). Remdesivir attenuates high fat diet (HFD)-induced NAFLD by regulating hepatocyte dyslipidemia and inflammation via the suppression of STING. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 526, 381–388.
- Li, F., Wang, X., Capasso, J.M., and Gerdes, A.M. (1996). Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28, 1737–1746.
- Li, F., Wang, Z., Hu, F., and Su, L. (2020). Cell Culture Models and Animal Models for HBV Study. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1179, 109–135.
- Liang, W., Lindeman, J.H., Menke, A.L., Koonen, D.P., Morrison, M., Havekes, L.M., van den Hoek, A.M., and Kleemann, R. (2014). Metabolically induced liver inflammation leads to NASH and differs from LPS- or IL-1 β -induced chronic inflammation. *Lab. Invest.* 94, 491–502.
- Lieber, C.S. (1965). Hyperuricemia induced by alcohol. *Arthritis Rheum.* 8, 786–798.
- Lin, C., Ballinger, K.R., and Khetani, S.R. (2015). The application of engineered liver tissues for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 10, 519–540.
- Lin, J., Shi, J., Guo, H., Yang, X., Jiang, Y., Long, J., Bai, Y., Wang, D., Yang, X., Wan, X., et al. (2019). Alterations in DNA Damage Repair Genes in Primary Liver Cancer. *Clin Cancer Res* 25, 4701–4711.
- Lin, Y.-H., Zhang, S., Zhu, M., Lu, T., Chen, K., Wen, Z., Wang, S., Xiao, G., Luo, D., Jia, Y., et al. (2020). Mice With Increased Numbers of Polyploid Hepatocytes Maintain Regenerative Capacity but Develop Fewer Tumors Following Chronic Liver Injury. *Gastroenterology*.
- Linhart, K.-B., Glassen, K., Peccerella, T., Waldherr, R., Linhart, H., Bartsch, H., and Seitz, H.K. (2015). The generation of carcinogenic etheno-DNA adducts in the liver of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg Nutr* 4, 117–123.
- Liu, W., Baker, S.S., Baker, R.D., and Zhu, L. (2015). Antioxidant Mechanisms in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Drug Targets* 16, 1301–1314.
- Llovet, J.M., Zucman-Rossi, J., Pikarsky, E., Sangro, B., Schwartz, M., Sherman, M., and Gores, G. (2016). Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers* 2, 1–23.
- López-Contreras, A.J., and Fernandez-Capetillo, O. (2010). The ATR barrier to replication-born DNA damage. *DNA Repair (Amst.)* 9, 1249–1255.
- Lotowska, J.M., Sobaniec-Lotowska, M.E., and Lebensztejn, D.M. (2013). The role of Kupffer cells in the morphogenesis of nonalcoholic steatohepatitis - ultrastructural findings. The first report in pediatric patients. *Scand. J. Gastroenterol.* 48, 352–357.

Lozano, E., Sáez, A.G., Flemming, A.J., Cunha, A., and Leroi, A.M. (2006). Regulation of growth by ploidy in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* *16*, 493–498.

Ludwig, J., Viggiano, T.R., McGill, D.B., and Oh, B.J. (1980). Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin. Proc.* *55*, 434–438.

Luedde, T., and Schwabe, R.F. (2011). NF- κ B in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *8*, 108–118.

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

Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R.S., Grofte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J., et al. (2011). 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat Cell Biol* *13*, 243–253.

Luo, X., Li, H., Ma, L., Zhou, J., Guo, X., Woo, S.-L., Pei, Y., Knight, L.R., Deveau, M., Chen, Y., et al. (2018). Expression of STING Is Increased in Liver Tissues From Patients With NAFLD and Promotes Macrophage-Mediated Hepatic Inflammation and Fibrosis in Mice. *Gastroenterology* *155*, 1971-1984.e4.

- M -

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

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

Mackay, G.M., Zheng, L., van den Broek, N.J.F., and Gottlieb, E. (2015). Analysis of Cell Metabolism Using LC-MS and Isotope Tracers. *Meth. Enzymol.* *561*, 171–196.

Maeda, S., Kamata, H., Luo, J.-L., Leffert, H., and Karin, M. (2005). IKK β Couples Hepatocyte Death to Cytokine-Driven Compensatory Proliferation that Promotes Chemical Hepatocarcinogenesis. *Cell* *121*, 977–990.

Magdalou, I., Lopez, B.S., Pasero, P., and Lambert, S.A.E. (2014). The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *30*, 154–164.

Malehmir, M., Pfister, D., Gallage, S., Szydłowska, M., Inverso, D., Kotsiliti, E., Leone, V., Peiseler, M., Surewaard, B.G.J., Rath, D., et al. (2019). Platelet GPIIb α is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer. *Nat. Med.* *25*, 641–655.

- Malhi, H., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., and Gores, G.J. (2006). Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J. Biol. Chem.* *281*, 12093–12101.
- Mao, S.A., Glorioso, J.M., and Nyberg, S.L. (2014). Liver regeneration. *Transl Res* *163*, 352–362.
- Mao, Y., Luo, W., Zhang, L., Wu, W., Yuan, L., Xu, H., Song, J., Fujiwara, K., Abe, J., LeMaire, S.A., et al. (2017). STING-IRF3 Triggers Endothelial Inflammation in Response to Free Fatty Acid-Induced Mitochondrial Damage in Diet-Induced Obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *37*, 920–929.
- Marcus, A., Mao, A.J., Lensink-Vasan, M., Wang, L., Vance, R.E., and Raulet, D.H. (2018). Tumor-Derived cGAMP Triggers a STING-Mediated Interferon Response in Non-tumor Cells to Activate the NK Cell Response. *Immunity* *49*, 754–763.e4.
- Margall-Ducos, G., Celton-Morizur, S., Couton, D., Br erie, O., and Desdouets, C. (2007). Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. *J. Cell. Sci.* *120*, 3633–3639.
- Mari , M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., Enrich, C., Fernandez-Checa, J.C., and García-Ruiz, C. (2006). Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab.* *4*, 185–198.
- Marra, F., and Svegliati-Baroni, G. (2018). Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *Journal of Hepatology* *68*, 280–295.
- Mashek, D.G., Khan, S.A., Sathyanarayan, A., Ploeger, J.M., and Franklin, M.P. (2015). Hepatic lipid droplet biology: Getting to the root of fatty liver. *Hepatology* *62*, 964–967.
- Mathews, C.K. (2015). Deoxyribonucleotide metabolism, mutagenesis and cancer. *Nature Reviews Cancer* *15*, 528–539.
- Mato, J.M., Alonso, C., Nouredin, M., and Lu, S.C. (2019). Biomarkers and subtypes of deranged lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* *25*, 3009–3020.
- Matsumoto, M., Hada, N., Sakamaki, Y., Uno, A., Shiga, T., Tanaka, C., Ito, T., Katsume, A., and Sudoh, M. (2013). An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *International Journal of Experimental Pathology* *94*, 93–103.
- Matsumoto, T., Wakefield, L., Tarlow, B.D., and Grompe, M. (2020). In Vivo Lineage Tracing of Polyploid Hepatocytes Reveals Extensive Proliferation during Liver Regeneration. *Cell Stem Cell* *26*, 34–47.e3.
- Mayer, J., Bates, M.W., and Dickie, M.M. (1951). Hereditary diabetes in genetically obese mice. *Science* *113*, 746–747.
- Mazouzi, A., Velimezi, G., and Loizou, J.I. (2014). DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Experimental Cell Research* *329*, 85–93.

- McCormack, L., Petrowsky, H., Jochum, W., Furrer, K., and Clavien, P.-A. (2007). Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann. Surg.* *245*, 923–930.
- McNelis, J.C., and Olefsky, J.M. (2014). Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity* *41*, 36–48.
- Mehal, W.Z. (2013). The Gordian Knot of dysbiosis, obesity and NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *10*, 637–644.
- Mells, J.E., Fu, P.P., Kumar, P., Smith, T., Karpen, S.J., and Anania, F.A. (2015). Saturated fat and cholesterol are critical to inducing murine metabolic syndrome with robust nonalcoholic steatohepatitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* *26*, 285–292.
- Meuth, M. (1989). The molecular basis of mutations induced by deoxyribonucleoside triphosphate pool imbalances in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* *181*, 305–316.
- Michalet, X., Ekong, R., Fougerousse, F., Rousseaux, S., Schurra, C., Hornigold, N., van Slegtenhorst, M., Wolfe, J., Povey, S., Beckmann, J.S., et al. (1997). Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* *277*, 1518–1523.
- Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C. (1997). Liver regeneration. *Science* *276*, 60–66.
- Michaut, A., Le Guillou, D., Moreau, C., Bucher, S., McGill, M.R., Martinais, S., Gicquel, T., Morel, I., Robin, M.A., Jaeschke, H., et al. (2016). A cellular model to study drug-induced liver injury in nonalcoholic fatty liver disease: Application to acetaminophen. *Toxicol Appl Pharmacol* *292*, 40–55.
- Miettinen, T.P., Pessa, H.K.J., Caldez, M.J., Fuhrer, T., Diril, M.K., Sauer, U., Kaldis, P., and Björklund, M. (2014). Identification of Transcriptional and Metabolic Programs Related to Mammalian Cell Size. *Current Biology* *24*, 598–608.
- Millay, D.P., O'Rourke, J.R., Sutherland, L.B., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2013). Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* *499*, 301–305.
- Miquilena-Colina, M.E., Lima-Cabello, E., Sánchez-Campos, S., García-Mediavilla, M.V., Fernández-Bermejo, M., Lozano-Rodríguez, T., Vargas-Castrillón, J., Buqué, X., Ochoa, B., Aspichueta, P., et al. (2011). Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut* *60*, 1394–1402.
- Mittal, S., El-Serag, H.B., Sada, Y.H., Kanwal, F., Duan, Z., Temple, S., May, S.B., Kramer, J.R., Richardson, P.A., and Davila, J.A. (2016). Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* *14*, 124-31 e1.

Miura, K., Kodama, Y., Inokuchi, S., Schnabl, B., Aoyama, T., Ohnishi, H., Olefsky, J.M., Brenner, D.A., and Seki, E. (2010). Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology* *139*, 323-334.e7.

Mokrani-Benhelli, H., Gaillard, L., Biasutto, P., Le Guen, T., Touzot, F., Vasquez, N., Komatsu, J., Conseiller, E., Picard, C., Gluckman, E., et al. (2013). Primary microcephaly, impaired DNA replication, and genomic instability caused by compound heterozygous ATR mutations. *Hum Mutat* *34*, 374–384.

Mokrani-Benhelli, H., Gaillard, L., Biasutto, P., Guen, T.L., Touzot, F., Vasquez, N., Komatsu, J., Conseiller, E., Picard, C., Gluckman, E., et al. (2013). Primary Microcephaly, Impaired DNA Replication, and Genomic Instability Caused by Compound Heterozygous ATR Mutations. *Human Mutation* *34*, 374–384.

Morales-Navarrete, H., Segovia-Miranda, F., Klukowski, P., Meyer, K., Nonaka, H., Marsico, G., Chernykh, M., Kalaidzidis, A., Zerial, M., and Kalaidzidis, Y. (2015). A versatile pipeline for the multi-scale digital reconstruction and quantitative analysis of 3D tissue architecture. *Elife* *4*.

Mota, M., Banini, B.A., Cazanave, S.C., and Sanyal, A.J. (2016). Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* *65*, 1049–1061.

Motwani, M., Pesiridis, S., and Fitzgerald, K.A. (2019). DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease. *Nat. Rev. Genet.* *20*, 657–674.

Mun, J., Kim, S., Yoon, H.-G., You, Y., Kim, O.-K., Choi, K.-C., Lee, Y.-H., Lee, J., Park, J., and Jun, W. (2019). Water Extract of *Curcuma longa* L. Ameliorates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* *11*.

Murthy, S., and Reddy, G.P.-V. (2006). Replisome: complete machinery for DNA synthesis. *J. Cell. Physiol.* *209*, 711–717.

Mutreja, K., Krietsch, J., Hess, J., Ursich, S., Berti, M., Roessler, F.K., Zellweger, R., Patra, M., Gasser, G., and Lopes, M. (2018). ATR-Mediated Global Fork Slowing and Reversal Assist Fork Traverse and Prevent Chromosomal Breakage at DNA Interstrand Cross-Links. *Cell Rep* *24*, 2629-2642.e5.

Nadal, C., and Zajdela, F. (1966). [Somatic polyploid cells in rat liver. I. The role of binuclear cells in the formation of the polyploid cells]. *Exp. Cell Res.* 42, 99–116.

Nagaya, T., Tanaka, N., Suzuki, T., Sano, K., Horiuchi, A., Komatsu, M., Nakajima, T., Nishizawa, T., Joshita, S., Umemura, T., et al. (2010). Down-regulation of SREBP-1c is associated with the development of burned-out NASH. *J. Hepatol.* 53, 724–731.

Nakagawa, H., Umemura, A., Taniguchi, K., Font-Burgada, J., Dhar, D., Ogata, H., Zhong, Z., Valasek, M.A., Seki, E., Hidalgo, J., et al. (2014a). ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development. *Cancer Cell* 26, 331–343.

Nakagawa, H., Umemura, A., Taniguchi, K., Font-Burgada, J., Dhar, D., Ogata, H., Zhong, Z., Valasek, M.A., Seki, E., Hidalgo, J., et al. (2014b). ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. *Cancer Cell* 26, 331–343.

Nakajima, T., Moriguchi, M., Katagishi, T., Sekoguchi, S., Nishikawa, T., Takashima, H., Kimura, H., Minami, M., Itoh, Y., Kagawa, K., et al. (2006). Premature telomere shortening and impaired regenerative response in hepatocytes of individuals with NAFLD. *Liver Int.* 26, 23–31.

Nakajima, T., Nakashima, T., Okada, Y., Jo, M., Nishikawa, T., Mitsumoto, Y., Katagishi, T., Kimura, H., Itoh, Y., Kagawa, K., et al. (2010). Nuclear size measurement is a simple method for the assessment of hepatocellular aging in non-alcoholic fatty liver disease: Comparison with telomere-specific quantitative FISH and p21 immunohistochemistry. *Pathol Int* 60, 175–183.

Nault, J.C., Mallet, M., Pilati, C., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Laurent, C., Laurent, A., Cherqui, D., Balabaud, C., Zucman-Rossi, J., et al. (2013). High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun* 4, 2218.

Nepal, M., Che, R., Zhang, J., Ma, C., and Fei, P. (2017). Fanconi Anemia Signaling and Cancer. *Trends Cancer* 3, 840–856.

Neupert, D., Glöckner, R., Neupert, G., and Müller, D. (2003). Ultrastructural changes in hepatocytes of precision-cut rat liver slices after incubation for 24 and 48 hours. *Exp. Toxicol. Pathol.* 54, 481–488.

Nishida, N., Yada, N., Hagiwara, S., Sakurai, T., Kitano, M., and Kudo, M. (2016). Unique features associated with hepatic oxidative DNA damage and DNA methylation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 31, 1646–1653.

N.Marieb, E. (2010). *Anatomie et Physiologie Humaines* (Pearson).

- O -

O'Brien S, N.W.G. (2006). Atlas of chromosomes.

O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V.L., Woods, C.G., Jeggo, P.A., and Goodship, J.A. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat. Genet.* *33*, 497–501.

Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonja, T., Tiniakos, D., Wilson, C.L., Lahat, A., Day, C.P., Burt, A., Palmer, A., Anstee, Q.M., et al. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun* *8*, 15691.

Oligschlaeger, Y., and Shiri-Sverdlov, R. (2020). NAFLD Preclinical Models: More than a Handful, Less of a Concern? *Biomedicines* *8*, 28.

Oparil, S., Bishop, S.P., and F J Clubb, J. (1984). Myocardial cell hypertrophy or hyperplasia. Hypertension.

Oral, E.A., Reilly, S.M., Gomez, A.V., Meral, R., Butz, L., Ajluni, N., Chenevert, T.L., Korytnaya, E., Neidert, A.H., Hench, R., et al. (2017). Inhibition of IKK ϵ and TBK1 Improves Glucose Control in a Subset of Patients with Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* *26*, 157-170.e7.

Organovo, E. (2018). Modeling NAFLD using 3D bioprinted human liver tissue.

Organovo, E. (2019). Cells isolated from donors with nonalcoholic fatty liver disease exhibit disease phenotypes in 3D bioprinted human liver tissue.

Orr-Weaver, T.L. (2015). When bigger is better: the role of polyploidy in organogenesis. *Trends in Genetics* *31*, 307–315.

Orvain, C., Lin, Y.-L., Jean-Louis, F., Hocini, H., Hersant, B., Bennasser, Y., Ortonne, N., Hotz, C., Wolkenstein, P., Boniotto, M., et al. (2020). Hair follicle stem cell replication stress drives IFI16/STING-dependent inflammation in hidradenitis suppurativa. *J. Clin. Invest.* *130*, 3777–3790.

- P -

Pacold, M.E., Brimacombe, K.R., Chan, S.H., Rohde, J.M., Lewis, C.A., Swier, L.J.Y.M., Possemato, R., Chen, W.W., Sullivan, L.B., Fiske, B.P., et al. (2016). A PHGDH inhibitor reveals coordination of serine synthesis and one-carbon unit fate. *Nat. Chem. Biol.* *12*, 452–458.

Paijo, J., Döring, M., Spanier, J., Grabski, E., Nooruzzaman, M., Schmidt, T., Witte, G., Messerle, M., Hornung, V., Kaever, V., et al. (2016). cGAS Senses Human Cytomegalovirus and Induces Type I Interferon Responses in Human Monocyte-Derived Cells. *PLoS Pathog.* *12*, e1005546.

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

Papatheodoridi, A.-M., Chrysavgis, L., Koutsilieris, M., and Chatzigeorgiou, A. (2020). The Role of Senescence in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Progression to Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* *71*, 363–374.

Paradis, V., Zalinski, S., Chelbi, E., Guedj, N., Degos, F., Vilgrain, V., Bedossa, P., and Belghiti, J. (2009). Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology* *49*, 851–859.

Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G.-Y., He, G., Ali, S.R., Holzer, R.G., Osterreicher, C.H., Takahashi, H., and Karin, M. (2010a). Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* *140*, 197–208.

Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G.-Y., He, G., Ali, S.R., Holzer, R.G., Osterreicher, C.H., Takahashi, H., and Karin, M. (2010b). Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* *140*, 197–208.

Parthasarathy, G., Revelo, X., and Malhi, H. (2020). Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. *Hepatol Commun* *4*, 478–492.

Patouraux, S., Rousseau, D., Bonnafous, S., Lebeaupin, C., Luci, C., Canivet, C.M., Schneck, A.-S., Bertola, A., Saint-Paul, M.-C., Iannelli, A., et al. (2017). CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* *67*, 328–338.

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

Perfield, J.W., Ortinau, L.C., Pickering, R.T., Ruebel, M.L., Meers, G.M., and Rector, R.S. (2013). Altered hepatic lipid metabolism contributes to nonalcoholic fatty liver disease in leptin-deficient Ob/Ob mice. *J Obes* *2013*, 296537.

Petrasek, J., Iracheta-Vellve, A., Csak, T., Satishchandran, A., Kodys, K., Kurt-Jones, E.A., Fitzgerald, K.A., and Szabo, G. (2013). STING-IRF3 pathway links endoplasmic reticulum stress with hepatocyte apoptosis in early alcoholic liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 16544–16549.

Pilié, P.G., Tang, C., Mills, G.B., and Yap, T.A. (2019). State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* *16*, 81–104.

Piscaglia, F., Svegliati-Baroni, G., Barchetti, A., Pecorelli, A., Marinelli, S., Tiribelli, C., Bellentani, S., and Group, H.-N.I.S. (2016). Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. *Hepatology* *63*, 827–838.

Pokatayev, V., Hasin, N., Chon, H., Cerritelli, S.M., Sakhuja, K., Ward, J.M., Morris, H.D., Yan, N., and Crouch, R.J. (2016). RNase H2 catalytic core Aicardi-Goutières syndrome-related mutant invokes cGAS-STING innate immune-sensing pathway in mice. *J. Exp. Med.* *213*, 329–336.

Poli, J., Tsaponina, O., Crabbé, L., Keszthelyi, A., Pantesco, V., Chabes, A., Lengronne, A., and Pasero, P. (2012). dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *EMBO J* *31*, 883–894.

Postic, C., and Girard, J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 829–838.

Puri, P., Mirshahi, F., Cheung, O., Natarajan, R., Maher, J.W., Kellum, J.M., and Sanyal, A.J. (2008). Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* *134*, 568–576.

- Q & R -

Qiao, J.T., Cui, C., Qing, L., Wang, L.S., He, T.Y., Yan, F., Liu, F.Q., Shen, Y.H., Hou, X.G., and Chen, L. (2018). Activation of the STING-IRF3 pathway promotes hepatocyte inflammation, apoptosis and induces metabolic disorders in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* *81*, 13–24.

Raabe, M., Véniant, M.M., Sullivan, M.A., Zlot, C.H., Björkegren, J., Nielsen, L.B., Wong, J.S., Hamilton, R.L., and Young, S.G. (1999). Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J. Clin. Invest.* *103*, 1287–1298.

Ragu, S., Matos-Rodrigues, G., and Lopez, B.S. (2020). Replication Stress, DNA Damage, Inflammatory Cytokines and Innate Immune Response. *Genes (Basel)* *11*.

Rahman, K., Desai, C., Iyer, S.S., Thorn, N.E., Kumar, P., Liu, Y., Smith, T., Neish, A.S., Li, H., Tan, S., et al. (2016). Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology* *151*, 733-746.e12.

Rajvanshi, P., Liu, D., Ott, M., Gagandeep, S., Schilsky, M.L., and Gupta, S. (1998). Fractionation of rat hepatocyte subpopulations with varying metabolic potential, proliferative capacity, and retroviral gene transfer efficiency. *Exp. Cell Res.* *244*, 405–419.

Ran, F.A., Cong, L., Yan, W.X., Scott, D.A., Gootenberg, J.S., Kriz, A.J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K.S., et al. (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* *520*, 186–191.

Rappaport, A.M. (1980). Hepatic blood flow: morphologic aspects and physiologic regulation. *Int Rev Physiol* *21*, 1–63.

- Rappaport, A.M., Borowy, Z.J., Loughheed, W.M., and Lotto, W.N. (1954). Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat. Rec.* *119*, 11–33.
- Raslova, H., Kauffmann, A., Sekkaï, D., Ripoche, H., Larbret, F., Robert, T., Tronik Le Roux, D., Kroemer, G., Debili, N., Dessen, P., et al. (2007). Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. *Blood* *109*, 3225–3234.
- Ratziu, V., Sheikh, M.Y., Sanyal, A.J., Lim, J.K., Conjeevaram, H., Chalasani, N., Abdelmalek, M., Bakken, A., Renou, C., Palmer, M., et al. (2012). A phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled study of GS-9450 in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *55*, 419–428.
- Ray, P.D., Huang, B.-W., and Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* *24*, 981–990.
- Reid, D.T., Reyes, J.L., McDonald, B.A., Vo, T., Reimer, R.A., and Eksteen, B. (2016). Kupffer Cells Undergo Fundamental Changes during the Development of Experimental NASH and Are Critical in Initiating Liver Damage and Inflammation. *PLoS ONE* *11*, e0159524.
- Reilly, S.M., Ahmadian, M., Zamarron, B.F., Chang, L., Uhm, M., Poirier, B., Peng, X., Krause, D.M., Korytnaya, E., Neidert, A., et al. (2015). A subcutaneous adipose tissue-liver signalling axis controls hepatic gluconeogenesis. *Nat Commun* *6*, 6047.
- Remely, M., Ferik, F., Sterneder, S., Setayesh, T., Kepcija, T., Roth, S., Noorizadeh, R., Greunz, M., Rebhan, I., Wagner, K.-H., et al. (2017). Vitamin E Modifies High-Fat Diet-Induced Increase of DNA Strand Breaks, and Changes in Expression and DNA Methylation of Dnmt1 and MLH1 in C57BL/6J Male Mice. *Nutrients* *9*.
- Ribeiro, P.S., Cortez-Pinto, H., Solá, S., Castro, R.E., Ramalho, R.M., Baptista, A., Moura, M.C., Camilo, M.E., and Rodrigues, C.M.P. (2004). Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am. J. Gastroenterol.* *99*, 1708–1717.
- Riccalton-Banks, L., Liew, C., Bhandari, R., Fry, J., and Shakesheff, K. (2003). Long-term culture of functional liver tissue: three-dimensional coculture of primary hepatocytes and stellate cells. *Tissue Eng.* *9*, 401–410.
- Ricchi, M., Odoardi, M.R., Carulli, L., Anzivino, C., Ballestri, S., Pinetti, A., Fantoni, L.I., Marra, F., Bertolotti, M., Banni, S., et al. (2009). Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *24*, 830–840.
- Rice, G.I., Bond, J., Asipu, A., Brunette, R.L., Manfield, I.W., Carr, I.M., Fuller, J.C., Jackson, R.M., Lamb, T., Briggs, T.A., et al. (2009). Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response. *Nat. Genet.* *41*, 829–832.

Richardson, M.M., Jonsson, J.R., Powell, E.E., Brunt, E.M., Neuschwander-Tetri, B.A., Bhathal, P.S., Dixon, J.B., Weltman, M.D., Tilg, H., Moschen, A.R., et al. (2007). Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* *133*, 80–90.

Riley, J.S., Quarato, G., Cloix, C., Lopez, J., O'Prey, J., Pearson, M., Chapman, J., Sesaki, H., Carlin, L.M., Passos, J.F., et al. (2018). Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis. *EMBO J.* *37*.

Rimmele, P., Komatsu, J., Hupe, P., Roulin, C., Barillot, E., Dutreix, M., Conseiller, E., Bensimon, A., Moreau-Gachelin, F., and Guillouf, C. (2010). Spi-1/PU.1 oncogene accelerates DNA replication fork elongation and promotes genetic instability in the absence of DNA breakage. *Cancer Res* *70*, 6757–6766.

Rinella, M.E., and Green, R.M. (2004). The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *Journal of Hepatology* *40*, 47–51.

Ringelhan, M., Pfister, D., O'Connor, T., Pikarsky, E., and Heikenwalder, M. (2018). The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nat. Immunol.* *19*, 222–232.

Roeder, A.H.K., Chickarmane, V., Cunha, A., Obara, B., Manjunath, B.S., and Meyerowitz, E.M. (2010). Variability in the control of cell division underlies sepal epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.* *8*, e1000367.

Rudnick, D.A., and Davidson, N.O. (2012). Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration. *Int J Hepatol* *2012*, 549241.

- S -

Saitoh, T., Fujita, N., Hayashi, T., Takahara, K., Satoh, T., Lee, H., Matsunaga, K., Kageyama, S., Omori, H., Noda, T., et al. (2009). Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 20842–20846.

Saldivar, J.C., Cortez, D., and Cimprich, K.A. (2017). The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 622–636.

Sanvisens, N., de Llanos, R., and Puig, S. (2013). Function and regulation of yeast ribonucleotide reductase: cell cycle, genotoxic stress, and iron bioavailability. *Biomed J* *36*, 51–58.

Sanyal, A., Poklepovic, A., Moyneur, E., and Barghout, V. (2010). Population-based risk factors and resource utilization for HCC: US perspective. *Curr Med Res Opin* *26*, 2183–2191.

Sanyal, A.J., Campbell-Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W.B., Contos, M.J., Sterling, R.K., Luketic, V.A., Shiffman, M.L., and Clore, J.N. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* *120*, 1183–1192.

- Sauer, J.-D., Sotelo-Troha, K., von Moltke, J., Monroe, K.M., Rae, C.S., Brubaker, S.W., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Woodward, J.J., Portnoy, D.A., et al. (2011). The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infect. Immun.* *79*, 688–694.
- Savard, C., Tartaglione, E.V., Kuver, R., Haigh, W.G., Farrell, G.C., Subramanian, S., Chait, A., Yeh, M.M., Quinn, L.S., and Ioannou, G.N. (2013). Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. *Hepatology* *57*, 81–92.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., et al. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* *268*, 1749–1753.
- Schejter, E.D. (2016). Myoblast fusion: Experimental systems and cellular mechanisms. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *60*, 112–120.
- Schild-Poulter, C., Su, A., Shih, A., Kelly, O.P., Fritzler, M.J., Goldstein, R., and Haché, R.J.G. (2008). Association of autoantibodies with Ku and DNA repair proteins in connective tissue diseases. *Rheumatology (Oxford)* *47*, 165–171.
- Schoggins, J.W., MacDuff, D.A., Imanaka, N., Gainey, M.D., Shrestha, B., Eitson, J.L., Mar, K.B., Richardson, R.B., Ratushny, A.V., Litvak, V., et al. (2014). Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* *505*, 691–695.
- Schughart, K., Kappen, C., and Ruddle, F.H. (1989). Duplication of large genomic regions during the evolution of vertebrate homeobox genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *86*, 7067–7071.
- Schults, M.A., Nagle, P.W., Rensen, S.S., Godschalk, R.W., Munnia, A., Peluso, M., Claessen, S.M., Greve, J.W., Driessen, A., Verdam, F.J., et al. (2012). Decreased nucleotide excision repair in steatotic livers associates with myeloperoxidase-immunoreactivity. *Mutat. Res.* *736*, 75–81.
- Schulze, K., Imbeaud, S., Letouzé, E., Alexandrov, L.B., Calderaro, J., Rebouissou, S., Couchy, G., Meiller, C., Shinde, J., Soysouvanh, F., et al. (2015). Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat. Genet.* *47*, 505–511.
- Schwabe, R.F., and Luedde, T. (2018). Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *15*, 738–752.
- Scully, R., Panday, A., Elango, R., and Willis, N.A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* *20*, 698–714.
- Seglen, P.O. (1997). DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival. *Cell Biol. Toxicol.* *13*, 301–315.

Segovia-Miranda, F., Morales-Navarrete, H., Kücken, M., Moser, V., Seifert, S., Repnik, U., Rost, F., Brosch, M., Hendricks, A., Hinz, S., et al. (2019). Three-dimensional spatially resolved geometrical and functional models of human liver tissue reveal new aspects of NAFLD progression. *Nat. Med.* 25, 1885–1893.

Seki, S., Kitada, T., Yamada, T., Sakaguchi, H., Nakatani, K., and Wakasa, K. (2002). In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J. Hepatol.* 37, 56–62.

Selzner, M., and Clavien, P.A. (2000). Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology* 31, 35–42.

Severin, E., Willers, R., and Bettecken, T. (1984). Flow cytometric analysis of mouse hepatocyte ploidy. II. The development of polyploidy pattern in four mice strains with different life spans. *Cell Tissue Res.* 238, 649–652.

Shalpour, S., Lin, X.-J., Bastian, I.N., Brain, J., Burt, A.D., Aksenov, A.A., Vrbanac, A.F., Li, W., Perkins, A., Matsutani, T., et al. (2017). Inflammation-induced IgA+ cells dismantle anti-liver cancer immunity. *Nature* 551, 340–345.

Shambaugh, G.E. (1977). Urea biosynthesis I. The urea cycle and relationships to the citric acid cycle. *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 2083–2087.

Sharma, A., and Nagalli, S. (2020). Chronic Liver Disease. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Sheth, K., and Bankey, P. (2001). The liver as an immune organ. *Curr Opin Crit Care* 7, 99–104.

Shimano, H., and Sato, R. (2017). SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology - divergent pathophysiology. *Nat Rev Endocrinol* 13, 710–730.

Shimano, H., Horton, J.D., Shimomura, I., Hammer, R.E., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.* 99, 846–854.

Shiojiri, N., Lemire, J.M., and Fausto, N. (1991). Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res.* 51, 2611–2620.

Simões, I.C.M., Fontes, A., Pinton, P., Zischka, H., and Wieckowski, M.R. (2018). Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 95, 93–99.

Singh, A., and Xu, Y.-J. (2016). The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea. *Genes (Basel)* 7.

Singh, S., Allen, A.M., Wang, Z., Prokop, L.J., Murad, M.H., and Loomba, R. (2015). Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 13, 643-54 e1-9; quiz e39-40.

- Sjögren, K., Liu, J.L., Blad, K., Skrtic, S., Vidal, O., Wallenius, V., LeRoith, D., Törnell, J., Isaksson, O.G., Jansson, J.O., et al. (1999). Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 7088–7092.
- Skov Olsen, P., Boesby, S., Kirkegaard, P., Therkelsen, K., Almdal, T., Poulsen, S.S., and Nexø, E. (1988). Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* *8*, 992–996.
- Sladky, V.C., Knapp, K., Soratroi, C., Heppke, J., Eichin, F., Rocamora-Reverte, L., Szabo, T.G., Bongiovanni, L., Westendorp, B., Moreno, E., et al. (2020). E2F-Family Members Engage the PIDDosome to Limit Hepatocyte Ploidy in Liver Development and Regeneration. *Dev. Cell* *52*, 335-349.e7.
- Sliter, D.A., Martinez, J., Hao, L., Chen, X., Sun, N., Fischer, T.D., Burman, J.L., Li, Y., Zhang, Z., Narendra, D.P., et al. (2018). Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature* *561*, 258–262.
- Sokolowska, O., and Nowis, D. (2018). STING Signaling in Cancer Cells: Important or Not? *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* *66*, 125–132.
- Stienstra, R., Saudale, F., Duval, C., Keshtkar, S., Groener, J.E.M., van Rooijen, N., Staels, B., Kersten, S., and Müller, M. (2010). Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology* *51*, 511–522.
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M.M.C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N.-M., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., et al. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc* *90*, 927–963.
- Stöcker, E., and Heine, W.D. (1971). Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. *Beitr Pathol* *144*, 400–408.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* *339*, 786–791.
- Sutti, S., Jindal, A., Locatelli, I., Vacchiano, M., Gigliotti, L., Bozzola, C., and Albano, E. (2014). Adaptive immune responses triggered by oxidative stress contribute to hepatic inflammation in NASH. *Hepatology* *59*, 886–897.
- Svendsen, P., Graversen, J.H., Etzerodt, A., Hager, H., Røge, R., Grønbaek, H., Christensen, E.I., Møller, H.J., Vilstrup, H., and Moestrup, S.K. (2017). Antibody-Directed Glucocorticoid Targeting to CD163 in M2-type Macrophages Attenuates Fructose-Induced Liver Inflammatory Changes. *Mol Ther Methods Clin Dev* *4*, 50–61.

Syn, W.-K., Oo, Y.H., Pereira, T.A., Karaca, G.F., Jung, Y., Omenetti, A., Witek, R.P., Choi, S.S., Guy, C.D., Fearing, C.M., et al. (2010). Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 51, 1998–2007.

Syn, W.-K., Agboola, K.M., Swiderska, M., Michelotti, G.A., Liaskou, E., Pang, H., Xie, G., Philips, G., Chan, I.S., Karaca, G.F., et al. (2012). NKT-associated hedgehog and osteopontin drive fibrogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 61, 1323–1329.

Szabo, G., and Petrasek, J. (2015). Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12, 387–400.

- T -

Tabibian, J.H., Masyuk, A.I., Masyuk, T.V., O’Hara, S.P., and LaRusso, N.F. (2013). Physiology of cholangiocytes. *Compr Physiol* 3, 541–565.

Taliento, E., Dallio, M., Frederico, A., and Valenti, L. (2019). Novel Insights Into the Genetic Landscape of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Environ Res Public Health* 1, 1–13.

Tan, X., Apte, U., Micsenyi, A., Kotsagrelis, E., Luo, J.-H., Ranganathan, S., Monga, D.K., Bell, A., Michalopoulos, G.K., and Monga, S.P.S. (2005). Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver. *Gastroenterology* 129, 285–302.

Tan, X., Sun, L., Chen, J., and Chen, Z.J. (2018). Detection of Microbial Infections Through Innate Immune Sensing of Nucleic Acids. *Annu Rev Microbiol* 72, 447–478.

Tanaka, S., Miyanishi, K., Kobune, M., Kawano, Y., Hoki, T., Kubo, T., Hayashi, T., Sato, T., Sato, Y., Takimoto, R., et al. (2013). Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.* 48, 1249–1258.

Tanami, S., Ben-Moshe, S., Elkayam, A., Mayo, A., Bahar Halpern, K., and Itzkovitz, S. (2017). Dynamic zonation of liver polyploidy. *Cell Tissue Res.* 368, 405–410.

Tang, Y., Bian, Z., Zhao, L., Liu, Y., Liang, S., Wang, Q., Han, X., Peng, Y., Chen, X., Shen, L., et al. (2011). Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Immunol* 166, 281–290.

Tanoli, T., Yue, P., Yablonskiy, D., and Schonfeld, G. (2004). Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: roles of the APOB defects, intra-abdominal adipose tissue, and insulin sensitivity. *J. Lipid Res.* 45, 941–947.

Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 836–847.

Taylor, A.M.R., Harnden, D.G., Arlett, C.F., Harcourt, S.A., Lehmann, A.R., Stevens, S., and Bridges, B.A. (1975). Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* 258, 427–429.

Taylor, A.M.R., Lam, Z., Last, J.I., and Byrd, P.J. (2015). Ataxia telangiectasia: more variation at clinical and cellular levels. *Clin. Genet.* 87, 199–208.

Tchkonia, T., Zhu, Y., van Deursen, J., Campisi, J., and Kirkland, J.L. (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J. Clin. Invest.* 123, 966–972.

Técher, H., Koundrioukoff, S., Azar, D., Wilhelm, T., Carignon, S., Brison, O., Debatisse, M., and Le Tallec, B. (2013). Replication dynamics: biases and robustness of DNA fiber analysis. *J. Mol. Biol.* 425, 4845–4855.

Técher, H., Koundrioukoff, S., Nicolas, A., and Debatisse, M. (2017). The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. *Nat. Rev. Genet.* 18, 535–550.

Techer, H., Koundrioukoff, S., Nicolas, A., and Debatisse, M. (2017). The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. *Nat Rev Genet* 18, 535–550.

Teodoro, J.S., Rolo, A.P., Duarte, F.V., Simões, A.M., and Palmeira, C.M. (2008). Differential alterations in mitochondrial function induced by a choline-deficient diet: understanding fatty liver disease progression. *Mitochondrion* 8, 367–376.

Teoh, N., Pyakurel, P., Dan, Y.Y., Swisshelm, K., Hou, J., Mitchell, C., Fausto, N., Gu, Y., and Farrell, G. (2010). Induction of p53 Renders ATM-Deficient Mice Refractory to Hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 138, 1155-1165.e2.

Teoh, N.C., Dan, Y.Y., Swisshelm, K., Lehman, S., Wright, J.H., Haque, J., Gu, Y., and Fausto, N. (2008). Defective DNA strand break repair causes chromosomal instability and accelerates liver carcinogenesis in mice. *Hepatology* 47, 2078–2088.

Teufel, U., Peccerella, T., Engelmann, G., Bruckner, T., Flechtenmacher, C., Millionig, G., Stickel, F., Hoffmann, G.F., Schirmacher, P., Mueller, S., et al. (2015). Detection of carcinogenic etheno-DNA adducts in children and adolescents with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Hepatobiliary Surg Nutr* 4, 426–435.

Thomsen, M.K., Nandakumar, R., Stadler, D., Malo, A., Valls, R.M., Wang, F., Reinert, L.S., Dagnaes-Hansen, F., Hollensen, A.K., Mikkelsen, J.G., et al. (2016). Lack of immunological DNA sensing in hepatocytes facilitates hepatitis B virus infection. *Hepatology* 64, 746–759.

Tietge, U.J., Bakillah, A., Maugeais, C., Tsukamoto, K., Hussain, M., and Rader, D.J. (1999). Hepatic overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) results in increased in vivo secretion of VLDL triglycerides and apolipoprotein B. *J. Lipid Res.* 40, 2134–2139.

Tilg, H., and Effenberger, M. (2020). From NAFLD to MAFLD: when pathophysiology succeeds. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.

Tilg, H., and Moschen, A.R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52, 1836–1846.

Tischkowitz, M., and Dokal, I. (2004). Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects. *Br. J. Haematol.* 126, 176–191.

Toledo, L., Neelsen, K.J., and Lukas, J. (2017). Replication Catastrophe: When a Checkpoint Fails because of Exhaustion. *Mol. Cell* 66, 735–749.

Toledo, L.I., Altmeyer, M., Rask, M.-B., Lukas, C., Larsen, D.H., Povlsen, L.K., Bekker-Jensen, S., Mairland, N., Bartek, J., and Lukas, J. (2013). ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* 155, 1088–1103.

Tomita, K., Tamiya, G., Ando, S., Ohsumi, K., Chiyo, T., Mizutani, A., Kitamura, N., Toda, K., Kaneko, T., Horie, Y., et al. (2006). Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut* 55, 415–424.

Tostões, R.M., Leite, S.B., Serra, M., Jensen, J., Björquist, P., Carrondo, M.J.T., Brito, C., and Alves, P.M. (2012). Human liver cell spheroids in extended perfusion bioreactor culture for repeated-dose drug testing. *Hepatology* 55, 1227–1236.

Toyoda, H., Kumada, T., Bregerie, O., Brechot, C., and Desdouets, C. (2006). Conserved balance of hepatocyte nuclear DNA content in mononuclear and binuclear hepatocyte populations during the course of chronic viral hepatitis. *World J. Gastroenterol.* 12, 4546–4548.

Tozzi, M.G., Camici, M., Mascia, L., Sgarrella, F., and Ipata, P.L. (2006). Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism. *FEBS J.* 273, 1089–1101.

Tummala, K.S., Gomes, A.L., Yilmaz, M., Graña, O., Bakiri, L., Ruppen, I., Ximénez-Embún, P., Sheshappanavar, V., Rodriguez-Justo, M., Pisano, D.G., et al. (2014). Inhibition of de novo NAD(+) synthesis by oncogenic URI causes liver tumorigenesis through DNA damage. *Cancer Cell* 26, 826–839.

Ullah, Z., Kohn, M.J., Yagi, R., Vassilev, L.T., and DePamphilis, M.L. (2008). Differentiation of trophoblast stem cells into giant cells is triggered by p57/Kip2 inhibition of CDK1 activity. *Genes Dev.* 22, 3024–3036.

Unhavaithaya, Y., and Orr-Weaver, T.L. (2012). Polyploidization of glia in neural development links tissue growth to blood-brain barrier integrity. *Genes Dev.* 26, 31–36.

Uygun, A., Kadayifci, A., Yesilova, Z., Erdil, A., Yaman, H., Saka, M., Deveci, M.S., Bagci, S., Gulsen, M., Karaeren, N., et al. (2000). Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *The American Journal of Gastroenterology* 95, 3584–3589.

Valenti, L.V.C., and Baselli, G.A. (2018). Genetics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A 2018 Update. *Curr Pharm Des* 24, 4566–4573.

Vallet-Pichard, A., Parlati, L., and Pol, S. (2019). Épidémiologie de la stéato-hépatite non alcoolique. Étendue du problème et son impact sur la santé publique. *La Presse Médicale* 48, 1459–1467.

Van de Peer, Y., Maere, S., and Meyer, A. (2009). The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat. Rev. Genet.* 10, 725–732.

Van de Peer, Y., Mizrachi, E., and Marchal, K. (2017). The evolutionary significance of polyploidy. *Nat Rev Genet* 18, 411–424.

Vandanmagsar, B., Youm, Y.-H., Ravussin, A., Galgani, J.E., Stadler, K., Mynatt, R.L., Ravussin, E., Stephens, J.M., and Dixit, V.D. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* 17, 179–188.

Vanpouille-Box, C., Demaria, S., Formenti, S.C., and Galluzzi, L. (2018). Cytosolic DNA Sensing in Organismal Tumor Control. *Cancer Cell* 34, 361–378.

Verbeek, J., Lannoo, M., Pirinen, E., Ryu, D., Spincemaille, P., Vander Elst, I., Windmolders, P., Thevissen, K., Cammue, B.P.A., van Pelt, J., et al. (2015). Roux-en-y gastric bypass attenuates hepatic mitochondrial dysfunction in mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 64, 673–683.

Vick, B., Weber, A., Urbanik, T., Maass, T., Teufel, A., Krammer, P.H., Opferman, J.T., Schuchmann, M., Galle, P.R., and Schulze-Bergkamen, H. (2009). Knockout of myeloid cell leukemia-1 induces liver damage and increases apoptosis susceptibility of murine hepatocytes. *Hepatology* 49, 627–636.

Viola-Magni, M.P. (1972). Synthesis and turnover of DNA in hepatocytes of neonatal rats. *J Microsc* 96, 191–203.

Viswanathan, P., Sharma, Y., Maisuradze, L., Tchaikovskaya, T., and Gupta, S. (2020). Ataxia telangiectasia mutated pathway disruption affects hepatic DNA and tissue damage in nonalcoholic fatty liver disease. *Exp. Mol. Pathol.* *113*, 104369.

- W -

Walker, A.I., Hunt, T., Jackson, R.J., and Anderson, C.W. (1985). Double-stranded DNA induces the phosphorylation of several proteins including the 90 000 mol. wt. heat-shock protein in animal cell extracts. *EMBO J.* *4*, 139–145.

Wan, J., Benkdane, M., Teixeira-Clerc, F., Bonnafous, S., Louvet, A., Lafdil, F., Pecker, F., Tran, A., Gual, P., Mallat, A., et al. (2014). M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *59*, 130–142.

Wang, G., Bonkovsky, H.L., de Lemos, A., and Burczynski, F.J. (2015). Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *J. Lipid Res.* *56*, 2238–2247.

Wang, M.-J., Chen, F., Li, J.-X., Liu, C.-C., Zhang, H.-B., Xia, Y., Yu, B., You, P., Xiang, D., Lu, L., et al. (2014a). Reversal of hepatocyte senescence after continuous in vivo cell proliferation. *Hepatology* *60*, 349–361.

Wang, X., Li, J., Riaz, D.R., Shi, G., Liu, C., and Dai, Y. (2014b). Outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* *12*, 394-402 e1.

Wang, X., Rao, H., Zhao, J., Wee, A., Li, X., Fei, R., Huang, R., Wu, C., Liu, F., and Wei, L. (2020). STING expression in monocyte-derived macrophages is associated with the progression of liver inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Lab. Invest.* *100*, 542–552.

Watanabe, A., Sohail, M.A., Gomes, D.A., Hashmi, A., Nagata, J., Sutterwala, F.S., Mahmood, S., Jhandier, M.N., Shi, Y., Flavell, R.A., et al. (2009). Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *296*, G1248-1257.

Weber, A., Boger, R., Vick, B., Urbanik, T., Haybaeck, J., Zoller, S., Teufel, A., Krammer, P.H., Opferman, J.T., Galle, P.R., et al. (2010). Hepatocyte-specific deletion of the antiapoptotic protein myeloid cell leukemia-1 triggers proliferation and hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology* *51*, 1226–1236.

Wegermann, K., Diehl, A.M., and Moylan, C.A. (2018). Disease pathways and molecular mechanisms of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis (Hoboken)* *11*, 87–91.

Weibel, E.R. (1969). Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.* *26*, 235–302.

- Weinert, T.A., Kiser, G.L., and Hartwell, L.H. (1994). Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev.* *8*, 652–665.
- Westerbacka, J., Kolak, M., Kiviluoto, T., Arkkila, P., Sirén, J., Hamsten, A., Fisher, R.M., and Yki-Järvinen, H. (2007). Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes* *56*, 2759–2765.
- White, R.R., Milholland, B., de Bruin, A., Curran, S., Laberge, R.-M., van Steeg, H., Campisi, J., Maslov, A.Y., and Vijg, J. (2015). Controlled induction of DNA double-strand breaks in the mouse liver induces features of tissue ageing. *Nat Commun* *6*, 6790.
- WHO, G. (2018). Globocan 2018.
- Wieckowska, A., Papouchado, B.G., Li, Z., Lopez, R., Zein, N.N., and Feldstein, A.E. (2008). Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* *103*, 1372–1379.
- Wilhelm, T., Ragu, S., Magdalou, I., Machon, C., Dardillac, E., Técher, H., Guitton, J., Debatisse, M., and Lopez, B.S. (2016). Slow Replication Fork Velocity of Homologous Recombination-Defective Cells Results from Endogenous Oxidative Stress. *PLoS Genet.* *12*, e1006007.
- Wilkinson, P.D., Delgado, E.R., Alencastro, F., Leek, M.P., Roy, N., Weirich, M.P., Stahl, E.C., Otero, P.A., Chen, M.I., Brown, W.K., et al. (2019). The Polyploid State Restricts Hepatocyte Proliferation and Liver Regeneration in Mice. *Hepatology* *69*, 1242–1258.
- Wilson, C.G., Tran, J.L., Erion, D.M., Vera, N.B., Febbraio, M., and Weiss, E.J. (2016). Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice. *Endocrinology* *157*, 570–585.
- Wirth, K.G., Wutz, G., Kudo, N.R., Desdouets, C., Zetterberg, A., Taghybeeglu, S., Seznec, J., Ducos, G.M., Ricci, R., Firnberg, N., et al. (2006). Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression. *J Cell Biol* *172*, 847–860.
- Wolber, E.-M., and Jelkmann, W. (2002). Thrombopoietin: the novel hepatic hormone. *News Physiol. Sci.* *17*, 6–10.
- Wolf, C., Rapp, A., Berndt, N., Staroske, W., Schuster, M., Dobrick-Mattheuer, M., Kretschmer, S., König, N., Kurth, T., Wiczorek, D., et al. (2016). RPA and Rad51 constitute a cell intrinsic mechanism to protect the cytosol from self DNA. *Nat Commun* *7*, 11752.
- Wolf, M.J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Egger, M., Wohlleber, D., et al. (2014). Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer Cell* *26*, 549–564.

Wong, R.J., Cheung, R., and Ahmed, A. (2014). Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. *Hepatology* 59, 2188–2195.

Wree, A., McGeough, M.D., Peña, C.A., Schlattjan, M., Li, H., Inzaugarat, M.E., Messer, K., Canbay, A., Hoffman, H.M., and Feldstein, A.E. (2014a). NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J. Mol. Med.* 92, 1069–1082.

Wree, A., Eguchi, A., McGeough, M.D., Pena, C.A., Johnson, C.D., Canbay, A., Hoffman, H.M., and Feldstein, A.E. (2014b). NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology* 59, 898–910.

Wu, L., Sun, J., Liu, L., Du, X., Liu, Y., Yan, X., Kombo Osoro, E., Zhang, F., Feng, L., Liang, D., et al. (2020). Anti-toll-like receptor 2 antibody ameliorates hepatic injury, inflammation, fibrosis and steatosis in obesity-related metabolic disorder rats via regulating MAPK and NF- κ B pathways. *Int. Immunopharmacol.* 82, 106368.

Wunderlich, F.T., Luedde, T., Singer, S., Schmidt-Supprian, M., Baumgartl, J., Schirmacher, P., Pasparakis, M., and Brüning, J.C. (2008). Hepatic NF-kappa B essential modulator deficiency prevents obesity-induced insulin resistance but synergizes with high-fat feeding in tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1297–1302.

- X -

Xiao, G., Zhang, T., Yu, S., Lee, S., Calabuig-Navarro, V., Yamauchi, J., Ringquist, S., and Dong, H.H. (2013). ATF4 protein deficiency protects against high fructose-induced hypertriglyceridemia in mice. *J. Biol. Chem.* 288, 25350–25361.

Xie, Z., Li, H., Wang, K., Lin, J., Wang, Q., Zhao, G., Jia, W., and Zhang, Q. (2010). Analysis of transcriptome and metabolome profiles alterations in fatty liver induced by high-fat diet in rat. *Metab. Clin. Exp.* 59, 554–560.

Xiong, X., Wang, Q., Wang, S., Zhang, J., Liu, T., Guo, L., Yu, Y., and Lin, J.D. (2019). Mapping the molecular signatures of diet-induced NASH and its regulation by the hepatokine Tsukushi. *Mol Metab* 20, 128–137.

Xu, M.M., Pu, Y., Han, D., Shi, Y., Cao, X., Liang, H., Chen, X., Li, X.-D., Deng, L., Chen, Z.J., et al. (2017). Dendritic Cells but Not Macrophages Sense Tumor Mitochondrial DNA for Cross-priming through Signal Regulatory Protein α Signaling. *Immunity* 47, 363-373.e5.

Xu, S., Ducroux, A., Ponnurangam, A., Vieyres, G., Franz, S., Müsken, M., Zillinger, T., Malassa, A., Ewald, E., Hornung, V., et al. (2016). cGAS-Mediated Innate Immunity Spreads Intercellularly through HIV-1 Env-Induced Membrane Fusion Sites. *Cell Host Microbe* 20, 443–457.

Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S., Huang, J., Yu, X.X., Pandey, S.K., Bhanot, S., Monia, B.P., Li, Y.-X., and Diehl, A.M. (2007). Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 45, 1366–1374.

Yang, S., Koteish, A., Lin, H., Huang, J., Roskams, T., Dawson, V., and Diehl, A.M. (2004). Oval cells compensate for damage and replicative senescence of mature hepatocytes in mice with fatty liver disease. *Hepatology* 39, 403–411.

Yang, Y.-G., Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2007). Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell* 131, 873–886.

Yao, Z.M., and Vance, D.E. (1988). The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 2998–3004.

Yin, C., Evason, K.J., Asahina, K., and Stainier, D.Y.R. (2013). Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J. Clin. Invest.* 123, 1902–1910.

Yoshino, J., Mills, K.F., Yoon, M.J., and Imai, S. (2011). Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab.* 14, 528–536.

Younossi, Z., Anstee, Q.M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., George, J., and Bugianesi, E. (2018a). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 15, 11–20.

Younossi, Z., Tacke, F., Arrese, M., Chander Sharma, B., Mostafa, I., Bugianesi, E., Wai-Sun Wong, V., Yilmaz, Y., George, J., Fan, J., et al. (2019). Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 69, 2672–2682.

Younossi, Z.M., Stepanova, M., Afendy, M., Fang, Y., Younossi, Y., Mir, H., and Srishord, M. (2011). Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 524-530.e1; quiz e60.

Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., and Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64, 73–84.

Younossi, Z.M., Henry, L., Bush, H., and Mishra, A. (2018b). Clinical and Economic Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease* 22, 1–10.

Yu, Q., Katlinskaya, Y.V., Carbone, C.J., Zhao, B., Katlinski, K.V., Zheng, H., Guha, M., Li, N., Chen, Q., Yang, T., et al. (2015). DNA-damage-induced type I interferon promotes senescence and inhibits stem cell function. *Cell Rep* 11, 785–797.

Yu, Y., Liu, Y., An, W., Song, J., Zhang, Y., and Zhao, X. (2019). STING-mediated inflammation in Kupffer cells contributes to progression of nonalcoholic steatohepatitis. *J. Clin. Invest.* *129*, 546–555.

- Z -

Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* *16*, 2–9.

Zhang, S., Zhou, K., Luo, X., Li, L., Tu, H.-C., Sehgal, A., Nguyen, L.H., Zhang, Y., Gopal, P., Tarlow, B.D., et al. (2018). The Polyploid State Plays a Tumor-Suppressive Role in the Liver. *Dev. Cell* *44*, 447-459.e5.

Zhang, X., Zhou, D., Strakovsky, R., Zhang, Y., and Pan, Y.-X. (2012). Hepatic cellular senescence pathway genes are induced through histone modifications in a diet-induced obese rat model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *302*, G558-564.

Zhao, X., Muller, E.G., and Rothstein, R. (1998). A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol. Cell* *2*, 329–340.

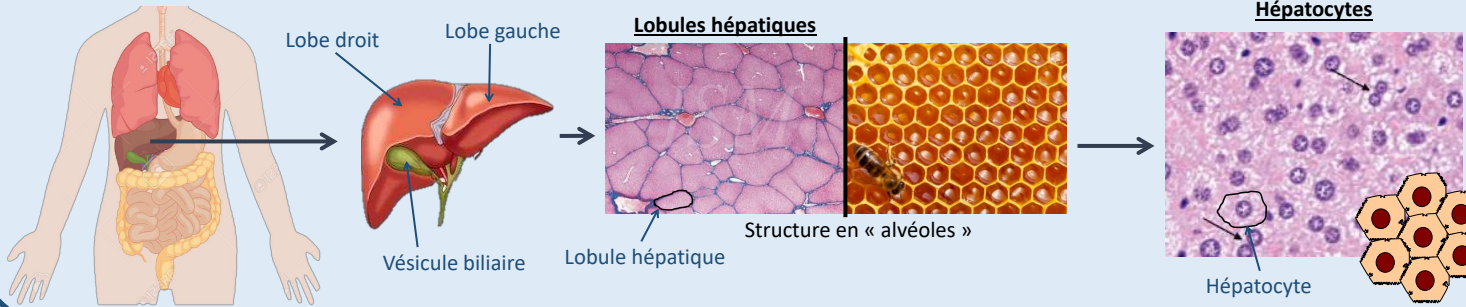
Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y.-Y., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P., et al. (2008). The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* *29*, 538–550.

Zhou, C., Chen, X., Planells-Cases, R., Chu, J., Wang, L., Cao, L., Li, Z., López-Cayuqueo, K.I., Xie, Y., Ye, S., et al. (2020). Transfer of cGAMP into Bystander Cells via LRRC8 Volume-Regulated Anion Channels Augments STING-Mediated Interferon Responses and Anti-viral Immunity. *Immunity* *52*, 767-781.e6.

Zhu, L., Baker, S.S., Liu, W., Tao, M.-H., Patel, R., Nowak, N.J., and Baker, R.D. (2011). Lipid in the livers of adolescents with nonalcoholic steatohepatitis: combined effects of pathways on steatosis. *Metab. Clin. Exp.* *60*, 1001–1011.

Le foie : un organe vital

Le foie est un organe situé sous le diaphragme et qui traverse la cavité abdominale sur toute sa largeur. C'est l'organe le plus volumineux de l'organisme (1,5kg). Il est divisé en deux parties : le lobe droit et le lobe gauche. La vésicule biliaire est située au niveau du lobe droit et sert de réservoir à la bile. Le foie reçoit environ 1,5 litres de sang par minute et intervient dans trois grandes fonctions vitales indispensables à notre organisme : (1) l'épuration des toxines ; (2) la synthèse des glucides (sucres), des lipides et des protéines essentiels à notre corps ; (3) le stockage des vitamines et du glycogène lors de la prise alimentaire. Le glycogène est l'assemblage de molécules de sucres qui serviront plus tard d'énergie lors de la période de jeûne. Le foie est organisé en lobules hépatiques, eux-mêmes constitués de différentes cellules. Les plus nombreuses sont les hépatocytes.



Pourquoi étudier le foie ?

Le cancer du foie est la 2^{ème} cause de mortalité par cancer dans le monde avec plus de 500 000 cas/an.

Les causes:

- Virus de l'hépatite B ou C (seul que l'on peut soigner)

- Consommation excessive d'alcool

- La « malbouffe »



Les modèles d'étude

La souris est un modèle très utilisé en recherche. Elle partage 99% ses gènes avec l'Homme et permet d'étudier de nombreuses maladies humaines. Pour reproduire les maladies hépatiques, plusieurs approches sont possibles :

- Des souris qui deviennent obèses suite à une mutation génétique

Souris normale



Souris obèse

- Des souris nourries avec des croquettes riches en graisse



Croquettes grasses



Le laboratoire dispose des deux modèles car ils sont complémentaires l'un de l'autre.

En pratique au laboratoire

COMPARER
la souris normale et la souris obèse

OBSERVER
au microscope

ANALYSER

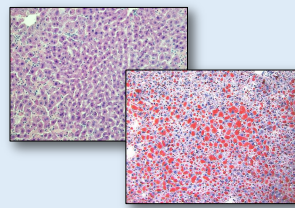
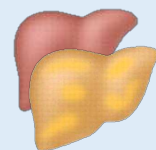
DEVENIR
Cela devient-il tumoral ?



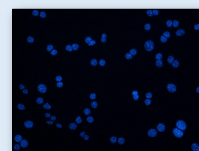
Souris normale



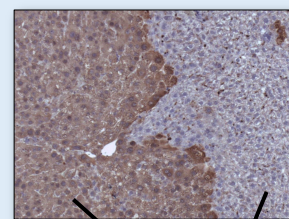
Souris obèse



Coloration du gras (rouge)



Coloration des noyaux (bleu)



tumeur

foie sain

Cellules isolées + Alcool ou gras